

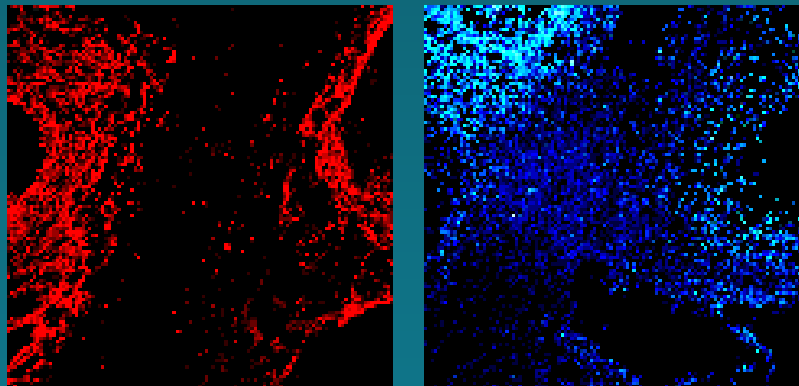


Universidad de Valencia  
Programa de Neurociencias Básicas y Aplicadas  
Departamento de Anatomía y Embriología Humana

Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Instituto de Biomedicina de Valencia



# Trasplante de glía envolvente olfatoria para reparar lesiones crónicas de la médula espinal de ratas adultas: de roedores a primates



TESIS DOCTORAL

Cintia Muñoz Quiles  
Valencia, 2007



# **Trasplante de glía envolvente olfatoria para reparar lesiones crónicas de la médula espinal de ratas adultas: de roedores a primates**

TESIS DOCTORAL DE CINTIA MUÑOZ QUILES  
DIRIGIDA POR LOS DOCTORES ALMUDENA RAMÓN  
CUETO Y FERNANDO F. SANTOS BENITO



Instituto de Biomedicina de Valencia



Dña. Almudena Ramón Cueto, Doctora en Medicina y Cirugía y Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y D. Fernando F. Santos Benito, Doctor en Ciencias Químicas e Investigador Contratado del CSIC

**CERTIFICAN:**

Que **Cintia Muñoz Quiles**, licenciada en Biología por la Universitat de València, ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título "Trasplante de glía envolvente olfatoria para reparar lesiones crónicas de la médula espinal de ratas adultas: de roedores a primates".

Revisado el presente trabajo, expresamos nuestra conformidad para la presentación del mismo por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctor.

En Valencia, a 2 de febrero de 2007

Dra. Almudena Ramón Cueto  
Unidad de Regeneración Neural  
Instituto de Biomedicina de Valencia

Dr. Fernando F. Santos Benito  
Unidad de Regeneración Neural  
Instituto de Biomedicina de Valencia

A mis padres y a Luis

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido con su ayuda a la realización de esta tesis:

En primer lugar a mis directores de tesis, Almudena y Fernando, por enseñarme miles de cosas, por animarme a seguir en muchas ocasiones de desaliento y porque sin ellos la realización de esta tesis no habría sido posible.

A toda la gente del laboratorio, los que se fueron y los que siguen al pie del cañón: A Mari Paz por su ayuda incondicional y por su sincera amistad (que espero conservar siempre). A Bea por estar siempre ahí, ¡somos las supervivientes! por su apoyo, por compartir tantas cosas conmigo (lo que nos hemos reído y lo que nos queda) y además por contribuir a que me mantenga en forma. A Lui por lo cuidadosa que fue con mis ratas, por su paciencia y por su gran sentido del humor. A Jesús y a Marina por los buenos ratos que me han hecho pasar. Y a todos los que pasaron por aquí y pusieron su granito de arena: Joaquín, Ana, Blanca, Rubén, Laura, Nati, Luis.

A todos mis vecinos y amigos del IBV, por hacerme olvidar los malos ratos con su sentido del humor y por hacer de las comidas algo por lo que mereciera la pena quedarse en el instituto y comer en tupper. A Paula (tan cariñosa y dulce), Santi (mi compi de beca desde el principio), Laia (la más loca), Pili (la más mami, siempre me das buenos consejos), Rafa (tan divertido), Marta (siempre dispuesta), Belén (tan majísima), Amalia (la más electropop), Toni (un pozo de sabiduría), Sheila (tan atenta), Carmina (tan sincera), Benito (siempre dispuesto a ayudarme con el microscopio), Vinni (tan gracioso). Encontraros en cualquier pasillo siempre fue motivo de alegría.

A mis amigas de la Facultad, las "Biolocas": Marga, Cris, Ana, Nadia y Paz, por estar siempre dispuestas a escuchar mis historietas, por sus consejos, por animarme con la planificación de alguno de nuestros viajes anuales en los momentos de desesperación, y por esos martes de terapia de grupo que siempre fueron uno de los alicientes de la semana.

A Gema, mi amiga desde... ¿los 4 años?, ¡casi mi hermana!, por estar presente en todos los momentos importantes de mi vida, sin fallar ni una sola vez. Siempre he tenido la sensación de poder contar contigo para cualquier cosa y espero seguir haciéndolo. Como ves, te persigo aunque te cambies de pueblo.

A la familia de Luis (mi familia también), por haber sido siempre tan buenos y cariñosos conmigo y por haberme recibido como uno más desde el principio. Y en especial a Mari Carmen, por sus exquisitos guisos que me han acompañado durante toda la realización de esta tesis, ¡no te imaginas lo importante que ha sido tu contribución!, muchísimas gracias.

A mi familia, por su apoyo incondicional, por habérmelo dado todo sin esperar nada a cambio, por contagiarme su sentido del humor (siempre presente en casa) y por haberse esforzado tanto por intentar hacer de mi vida un camino de rosas. Todo lo que pueda escribir en esta hoja me parece poco para expresar mi inmenso agradecimiento, no sé qué haría sin vosotros, ¡os quiero un montón!.

Y por último a Luis, por su paciencia infinita, su optimismo, su facilidad para hacerme sentir que nada es tan complicado, y por su empeño en hacerme confiar un poco más en mí. Sin tu apoyo y tu cariño no habría sido capaz de llegar al final. Por lo bien que lo he pasado contigo durante estos años de convivencia (y espero seguir haciéndolo) y por haberme elegido como compañera de deudas ¡mil gracias!.

## ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AMPA: Ácido  $\alpha$  -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico ( $\alpha$  -Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolepropionic Acid).

APP: Proteína precursora de amiloide (Amyloid Precursor Protein).

ATP: Adenosina trifosfato (Adenosine Triphosphate).

BBB: Test de comportamiento en campo abierto de Basso, Beattie y Bresnahan.

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro (Brain Derived Neurotrophic Factor).

BO: Bulbo olfatorio.

CNTF: Factor neurotrófico ciliar (Ciliary Neurotrophic Factor).

Cr: Crónico.

CSPGs: Proteoglicanos condroitín sulfato (Chondroitin Sulphate Proteoglycans).

D/F: Mezcla 1:1 de los medios de cultivo DMEM y F-12 de Ham.

D/F-10S: Medio de cultivo D/F con suero fetal bovino al 10%.

DAB: Diamino-bencidina.

Derived Growth Factor Receptor  $\alpha$ ).

DMEM: Medio Eagle modificado según Dulbecco (Dulbecco's Modification of

DPs: Duplicaciones Poblacionales.

Eagle's Medium).

EL: Capa epitelial o endimaria (Ependymal Layer).

EPL: Capa plexiforme externa (External Plexiform Layer).

EPO: Eritropoietina.

ESM: Error estándar de la media.

Factor).

Fig.: Figura.

GAP: Proteínas asociadas a crecimiento (Growth Associated Proteins).

GDNF: Factor neurotrófico derivado de la glía (Glial Derived Neurotrophic Factor).

GFAP: Proteína ácida de los filamentos gliales (Glial Fibrillary Acidic Protein).

GL: Capa glomerular (Glomerular Layer).

GM1: Gangliósido Monosálico.

GrL: Capa de los granos o granular interna (Internal Granular Layer).

GTP: Guanosina trifosfato (Guanosine Triphosphate).

HBSS: Solución salina equilibrada de Hank (Hank's Balanced Salt Solution).

HRP: Peroxidasa de rábano (Horseradish Peroxidase).

IPL: Capa plexiforme interna (Internal Plexiform Layer).

L: Lumbar.

LIF: Factor inhibitorio de leucemia (Leukemia Inhibitory Factor).

MAG: Glicoproteína asociada a mielina (Myelin-Associated Glycoprotein).

ME: Médula espinal.

ML: Capa de las células mitrales (Mitral Cell Layer).

Nerve Growth Factor Receptor).

NF: Neurofilamento.

NGF: Factor de crecimiento nervioso (Nerve Growth Factor).

NgR: Receptor de Nogo-66 (Nogo-66 Receptor).

NMDA: N-Metil-D-Aspartato.

NO: Óxido nítrico (Nitric Oxide).

No-T: No trasplantado.

NT-3: Neurotrofina-3.

NTN: Neurturina.

OEG: Glía envolvente olfatoria (Olfactory Ensheathing Glia).

OMgp: Glicoproteínas de la mielina de los oligodendrocitos (Oligodendrocyte-Myelin glycoprotein).

ONGL: Capas de los nervios olfatorios y glomerular del bulbo olfatorio (Olfactory Nerve and Glomerular Layers).

ONL: Capa de los nervios olfatorios (Olfactory Nerve Layer).

p75-NGFR: Receptor de baja afinidad del factor de crecimiento nervioso p75 (p75-).

PBS: Tampón fosfato salino (Phosphate Buffer Saline).

PDGFR  $\alpha$ : Receptor  $\alpha$  del factor de crecimiento derivado de plaquetas (Platelet-).

PEX: Extracto de pituitaria (Pituitary Extract).

ROS: Especies reactivas del oxígeno (Reactive Oxygen Species).

SA: Subagudo.

SNC: Sistema nervioso central.

SNP: Sistema nervioso periférico.

T: Torácico.

TBS: Tampón Tris salino (Tris Buffer Saline).

TNF  $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  ).



Tx: Tritón.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular (Vascular Endothelial Growth

WGA: Aglutinina de germen de trigo (Weat Germ Agglutining).

$\beta$ -Gal-AS:  $\beta$ -Galactosidasa Asociada a Senescencia.



## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
I. Anatomía funcional de la médula espinal	3
I.1. Sustancia gris	4
I.1.1. Las láminas de Rexed	5
I.2. Sustancia blanca	7
I.2.1. Vías descendentes	7
I.2.2. Vías ascendentes	11
I.3. Diferencias en la organización motora entre roedores, primates y humanos	12
II. La lesión traumática de la médula espinal y sus tipos	14
III. Consecuencias de la lesión traumática de la médula espinal	15
III.1. Alteraciones histológicas	15
III.1.1. Daño primario	15
III.1.2. Daño secundario	16
a) Muerte celular por necrosis y apoptosis	16
b) Isquemia	18
c) Excitotoxicidad	18
d) Formación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	18
e) Reacción inflamatoria	19
f) Edema	20
g) Disrupción axonal y degeneración Walleriana	20
h) La cicatriz glial y células inhibitoras	21
i) Moléculas inhibitoras del crecimiento axonal	24
III.2. Fases de la lesión traumática	25
III.2.1. Fase aguda	25
III.2.2. Fase subaguda	26
III.2.3. Fase crónica	26
III.3. Consecuencias funcionales tras una sección completa de la médula espinal	27

IV. Cuidados y pautas de tratamiento en pacientes con lesión medular completa	28
V. Modelos animales de lesión traumática en la médula espinal	32
VI. Estrategias experimentales empleadas para reparar las lesiones de la médula espinal.	34
VI.1. Fijación de la columna vertebral	35
VI.2. Administración de factores neuroprotectores y promotores de supervivencia y crecimiento axonal	36
VI.3. Bloqueo de moléculas inhibitoras del crecimiento axonal presentes en la cicatriz glial y la mielina	39
VI.4. Administración de factores para potenciar la capacidad regenerativa intrínseca de las neuronas.	41
VI.5. Trasplantes de tejido y celulares	42
VII. Estructura del bulbo olfatorio (BO)	44
VIII. Glía envolvente olfatoria (OEG)	48
VIII.1. Propiedades de la OEG que la convierten en buen instrumento para promover la regeneración axonal en el sistema nervioso central (SNC)	51
VIII.2. El BO y el epitelio olfatorio como fuente de OEG para terapia regenerativa del SNC	53
VIII.3. Utilización de la glía envolvente olfatoria para reparar lesiones medulares	55
<b>OBJETIVOS</b>	61
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	65
I. CULTIVOS CELULARES	65
I.1. Cultivos primarios de OEG de rata	65
I.2. Purificación de OEG de rata que expresa p75	65
I.3. Cultivos primarios de OEG de mono	66
I.4. Sub-cultivos de OEG de mono y de rata	67
I.5. Preparación de la OEG para los trasplantes	68
I.6. Cálculo de las duplicaciones poblacionales (DPs)	68

I.7. Estudio del efecto de los agentes mitógenos	69
I.8. Estudio del efecto de la congelación-descongelación	69
I.9. Estudio del efecto de la concentración de oxígeno	69
II. TINCIONES DE LOS CULTIVOS CELULARES	70
II.1. Inmunocitoquímica	70
II.2. Co-tinción de la actividad $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia ( $\beta$ -Gal-AS) y p75	71
III. CIRUGÍAS	71
III.1. Grupos experimentales	71
III.2. Primera cirugía: cirugía de lesión	72
III.3. Segunda cirugía: trasplante de OEG	72
III.4. Tercera cirugía: Inyección del trazador neuroanatómico	74
IV. FIJACIÓN DE LA COLUMNA VERTEBRAL	75
IV.1. Fabricación de los puentes de cemento	75
IV.2. Estudio de la inocuidad del cemento dental sobre médulas espinales no lesionadas	77
V. CUIDADOS POST-OPERATORIOS	77
V.1. Cuidados diarios y tratamiento de complicaciones	77
V.2. Fisioterapia y rehabilitación	81
VI. ESTUDIO DE LA RECUPERACIÓN FUNCIONAL	81
VI.1. Test de la rampa inclinada	81
VI.2. Test de comportamiento en campo abierto (BBB)	82
VII. HISTOLOGÍA	84
VII.1. Perfusión de los animales y procesado del tejido	84
VII.2. Revelado del trazador mediante inmunohistoquímica frente a aglutinina de germen de trigo (WGA)	84
VII.3. Inmunohistoquímica de las médulas espinales	85

VIII. MEDIDAS HISTOLÓGICAS	86
VIII.1. Medida de la degeneración secundaria en la zona de la lesión	86
VIII.2. Cuantificación de la presencia de axones en la zona de la lesión	87
VIII.3. Cuantificación de las neuronas regeneradas	87
IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	87
<b>RESULTADOS</b>	91
I. RECUPERACIÓN FUNCIONAL DE RATAS PARAPLÉJICAS Y REGENERACIÓN AXONAL EN SUS MÉDULAS ESPINALES MEDIANTE TRASPLANTE DE OEG EN LA FASE SUBAGUDA Y CRÓNICA DE LA LESIÓN	91
I.1. Recuperación funcional de ratas parapléjicas	91
<i>I.1.1. Evaluación de la recuperación del movimiento voluntario mediante el test de la rampa inclinada</i>	92
<i>I.1.2. Test de comportamiento en campo abierto (BBB)</i>	100
I.2. Medida del volumen de degeneración secundaria en las médulas lesionadas	103
I.3. Regeneración axonal de neuronas procedentes del tronco del encéfalo	108
II. EFECTOS DE LA FIJACIÓN DE LA COLUMNA VERTEBRAL EN LA REPARACIÓN MEDULAR DE LOS ANIMALES DE ESTE ESTUDIO.	116
II.1. Estudio de la inocuidad y firmeza del método utilizado para estabilizar la columna vertebral	116
II.2. Efecto promovido por la estabilización de la columna sobre el desarrollo de escoliosis	118
II.3. Recuperación funcional espontánea de animales parapléjicos promovida por la fijación de la columna vertebral	119

III. CARACTERIZACIÓN DE LA OEG PROCEDENTE DE BULBOS OLFATORIOS DE PRIMATES ADULTOS EN COMPARACIÓN CON LA OEG DE ROEDORES PARA SU POSIBLE USO EN TERAPIA	120
III.1. Propiedades de cultivos de OEG procedente de bulbos olfatorios de primates adultos	121
III.2. Estudio de la vida media de la OEG de roedor y de primate adultos en cultivo	123
III.3. Cambios fenotípicos de la OEG de roedor y de primate adultos tras periodos largos en cultivo	126
<i>III.3.1. Cambios morfológicos</i>	126
<i>III.3.2. Propiedades inmunocitoquímicas</i>	129
III.4. Actividad beta galactosidasa asociada a senescencia ( $\beta$ -Gal-AS)	132
III.5. Efecto del estrés oxidativo causado por las condiciones de cultivo sobre la OEG de roedor y de primate adultos	134
<b>DISCUSIÓN</b>	139
I. El test de la rampa inclinada es adecuado para evaluar la recuperación funcional de ratas parapléjicas con lesión completa de su médula espinal.	140
II. El trasplante de OEG, tras uno y cuatro meses de la lesión, promueve la recuperación funcional de ratas parapléjicas con lesión completa de sus médulas espinales.	144
III. La regeneración axonal, a través de la zona de la lesión, de neuronas del tronco del encéfalo parece ser la responsable de la recuperación funcional observada.	146
IV. La OEG trasplantada en las fases subaguda y crónica de la lesión no promueve la regeneración del haz corticoespinal a través de la zona de la lesión.	151

V. Las neuronas del tronco del encéfalo conservan la capacidad de responder a factores promotores de la regeneración, al menos, durante cuatro meses después de la lesión.	153
VI. La fijación de la columna vertebral con puentes de cemento promueve una discreta recuperación funcional espontánea en los animales no trasplantados.	155
VII. Existen diferentes mecanismos mediante los cuales la OEG podría estar promoviendo la regeneración axonal.	157
VIII. Los bulbos olfatorios de primate proporcionan OEG no-senescente mientras que la OEG de roedor se encuentra en estado pre-senescente y envejece pronto en cultivo.	161
IX. Un solo bulbo olfatorio de primate proporciona células suficientes y fiables para su uso en terapia y su almacenaje.	164
<b>CONCLUSIONES</b>	171
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	177



## INTRODUCCIÓN

Las lesiones de la médula espinal son muy frecuentes en nuestra sociedad y ocasionan consecuencias funcionales devastadoras en los pacientes que las sufren. Numerosos grupos de investigación están intentando encontrar una terapia eficaz en animales de laboratorio que en un futuro pueda ser aplicada en personas. En nuestro grupo utilizamos los trasplantes de glía envolvente olfatoria como estrategia reparadora de las lesiones traumáticas de la médula espinal, obteniendo resultados positivos cuando estas células son trasplantadas inmediatamente después de la lesión (fase aguda). En esta tesis doctoral hemos pretendido ir un paso más allá evaluando si la terapia con glía envolvente es también eficaz cuando ha pasado tiempo de la lesión (fase subaguda y crónica) ya que, de ser así, se abriría una esperanza para las personas que llevan tiempo lesionadas y, de aplicarse en clínica, además se garantizaría una ventana temporal desde el momento de la lesión para una mejor preparación tanto de las células como del paciente. También, en un intento por acercar nuestra experiencia a la clínica, en esta tesis hemos caracterizado la glía envolvente de bulbos olfatorios de primates.

En este apartado de la tesis se han incluido aspectos teóricos sobre la organización y estructura de la médula espinal y sobre las consecuencias de su lesión, para aportar las bases de lo que se describe en la sección de resultados. También se ha incluido la información existente sobre reparación de lesiones medulares y sobre la glía envolvente olfatoria y su utilización como reparadora de las lesiones medulares en roedores para enmarcar la tesis en su contexto científico actual.

### **I. Anatomía funcional de la médula espinal**

La médula espinal (ME) es una estructura del sistema nervioso central (SNC) que presenta una morfología similar en todos los mamíferos. Puesto que la rata es el animal utilizado en este estudio, nos centraremos en la anatomía funcional de su médula espinal.

La ME presenta una morfología cilíndrica, ligeramente aplanada dorso-ventralmente, y que se aloja en el interior del conducto raquídeo de la columna vertebral. Rostralmente se continúa con el bulbo raquídeo del tronco del encéfalo a través del agujero occipital del cráneo y caudalmente se afila, de manera

brusca, dando lugar al *cono terminalis*, de donde parte una fina banda de tejido conjuntivo que la une a la primera vértebra coccígea. Está rodeada por las meninges que de fuera a dentro son: la duramadre, la aracnoides y la piamadre (Fig. 1A). Posee en la línea media ventral una cisura longitudinal profunda, el surco medio ventral, y en la dorsal un surco más superficial, la cisura medial dorsal. De rostral a caudal se pueden distinguir cuatro regiones en la ME: cervical, torácica, lumbar y sacra. A lo largo de todo su eje longitudinal, la ME mantiene una organización segmentaria, y cada segmento mantiene un patrón estructural parecido. De este modo, de cada segmento espinal nacen, bilateralmente, dos raíces dorsales y dos ventrales (Fig. 1A). Los axones sensoriales de las neuronas de los ganglios dorsales penetran en la ME por las raíces dorsales, mientras que los axones motores y autónomos procedentes de las neuronas espinales, salen de la ME por las raíces ventrales para inervar respectivamente la musculatura y los órganos internos del cuerpo.

La función de la ME consiste en la transmisión ascendente hasta centros superiores de información procedente de terminaciones sensitivas periféricas, y en la transmisión descendente desde centros superiores de la información necesaria para el control de la actividad muscular esquelética. Para poder realizar su función con éxito la médula espinal requiere, en primer lugar, una alta especialización morfológica y fisiológica de las células que la componen, y una precisa ordenación histológica de éstas. Una sección transversal de la médula espinal muestra un área central en forma de H, formada por la sustancia gris, que es donde se ubican los cuerpos celulares de las neuronas. Esta se encuentra rodeada por la sustancia blanca, que está formada por fibras nerviosas, neuroglía y vasos sanguíneos. A continuación describiré en detalle la estructura de estas dos partes de la ME.

### **I.1. Sustancia gris**

La sustancia gris se puede dividir en cuatro grandes áreas: astas dorsales, astas laterales, astas ventrales y comisura gris (Fig. 1A). En 1952, Rexed dividió la sustancia gris de la ME de gato en 10 láminas, basándose en la morfología de las neuronas tras hacer una tinción de Nissl (Rexed, 1952; Paxinos, 1995). Esta división además, coincide con una división funcional ya que cada lámina media una función diferente siendo el origen de vías ascendentes concretas o recibiendo información

descendente procedente de centros superiores (descrito en detalle en los apartados 1.1.1, 1.2.1 y 1.2.2). Rexed propuso que todas las características observadas en el gato eran válidas para todos los mamíferos (Paxinos, 1995). La citoarquitectura medular varía ligeramente desde la región cervical a la sacra. Como la región medular en la que realizamos nuestros estudios es la torácica baja, me limitaré a describir las láminas en esta zona (Fig. 1B).

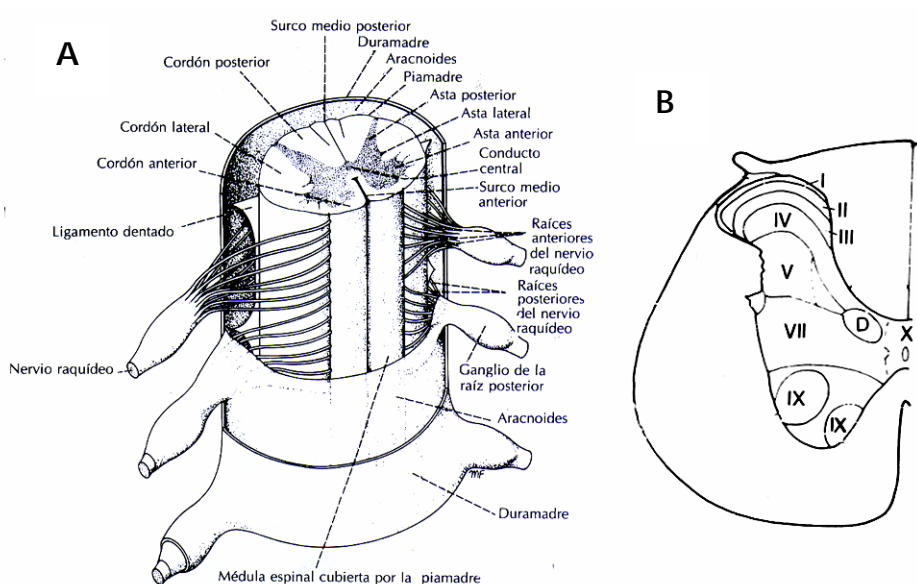


Figura 1. A. Esquema de la morfología de la médula espinal. B. Representación de las láminas de Rexed a nivel torácico bajo (Paxinos, 1995).

### 1.1.1. Las láminas de Rexed

La lámina I es la más dorsal de todas y contiene células de diversos tamaños y formas. Las neuronas de esta lámina proyectan sus axones al tronco cerebral, al hipotálamo y principalmente al tálamo, formando parte del fascículo espinotalámico y transportando información de dolor y temperatura. La lámina II o sustancia gelatinosa de Rolando se distingue fácilmente por la presencia de células pequeñas, de tamaño uniforme y un neuropilo muy empaquetado. Las células de esta lámina envían sus axones a la formación reticular del bulbo raquídeo, al

tálamo y al tronco del encéfalo. Los dos tercios más externos de esta lámina lo forman células que responden a estímulos cutáneos nociceptivos mientras que las de la parte más interna responden sólo a estímulos inocuos. La lámina III tiene unas neuronas más grandes que la II y menos empaquetadas. Sus neuronas proyectan sus axones a otras regiones del mismo segmento medular, a la médula cervical, al bulbo raquídeo y al tálamo, y responden a estímulos mecánicos ligeros. La lámina IV tiene neuronas muy heterogéneas y a nivel torácico bajo se extiende medialmente hasta alcanzar la columna de Clarke o núcleo dorsal. Sus neuronas proyectan localmente dentro de la ME, al núcleo cervical lateral, al núcleo de la columna dorsal y al tálamo. Algunas de ellas responden solo a estímulos mecánicos suaves y otras son específicamente nociceptivas. Las láminas anteriormente descritas son curvas y concéntricas, con su lado convexo orientado dorsalmente. La lámina V forma el límite inferior del asta dorsal, se extiende desde la parte lateral de la sustancia gris medialmente hasta el núcleo de Clarke y tiene un aspecto reticular. Sus neuronas proyectan al núcleo cervical lateral, al núcleo de la columna dorsal, a la formación reticular del tronco del encéfalo, al cerebro medio, al cerebelo, al tálamo y a otras partes de la ME, y responden tanto a estímulos nociceptivos como a estímulos mecánicos suaves. La lámina VI no existe en la región torácica. La lámina VII constituye la zona intermedia de la sustancia gris, situada ventralmente al asta dorsal y rodeando a la lámina X. Esta lámina contiene el núcleo intermediolateral desde el segmento torácico 1 al lumbar 3 (T1-L3, neuronas simpáticas preganglionares) y el núcleo intermediomedial en toda la longitud medular. La lámina VII contiene neuronas que envían sus axones al cerebelo, a otras partes de la ME, a la formación reticular del tronco del encéfalo y al tálamo. Estas neuronas reciben aferencias viscerales. La lámina VIII constituye la mayoría del asta ventral y tiene células de diferentes tamaños que proyectan a la formación reticular del tronco del encéfalo, al tálamo y al mismo segmento medular u otros más distales. La lámina IX no forma una verdadera lámina. Se trata de columnas de motoneuronas, que forman núcleos dentro de la lámina VIII, pero a los que se clasifica como lámina independiente. Estas motoneuronas proyectan sus axones a través de las raíces ventrales, las columnas más mediales inervan la musculatura axial y las laterales la musculatura de las extremidades. La lámina X constituye la comisura gris, que es la porción de sustancia gris que une las astas

dorsales y ventrales de cada lado. En el centro de la comisura gris se encuentra el canal central que divide la comisura en dorsal y ventral (Fig. 1B). A sus neuronas llegan aferencias viscerales y haces reticuloespinales, y responden a estímulos nociceptivos. Proyectan al tronco del encéfalo, al tálamo y al hipotálamo (Paxinos, 1995).

### **I.2. Sustancia blanca**

La sustancia blanca, que se encuentra rodeando a la sustancia gris de la ME puede dividirse topográficamente en tres cordones: dorsal o posterior, lateral y ventral o anterior. Estos están formados por los axones que conectan distintas zonas de la ME entre sí y la sustancia gris de la ME con centros nerviosos superiores. Así pues, en los cordones pueden distinguirse vías descendentes, ascendentes y locales (Fig. 2). A continuación presentaré un esquema de las principales vías descendentes en cuya regeneración se ha centrado nuestro estudio, las neuronas supraespinales que las originan, y las láminas medulares donde hacen sinapsis dichas vías. También describiré brevemente las principales vías ascendentes:

#### **I.2.1. Vías descendentes:**

##### ***Tracto corticoespinal***

**Origen:** Principalmente en la corteza motora primaria, (Fr1 + Fr3, Fig. 2A), y en la corteza sensitiva primaria en las partes de las patas delanteras y traseras (FL y HL, Fig. 2A).

**Localización medular:** Estos haces decusan en la región caudal del bulbo raquídeo y discurren por la parte más ventral del cordón dorsal. Existe también una porción mucho menor de este tracto que no decusa y que discurre por el cordón ventral (Fig. 2B).

**Destino:** Termina en todas las láminas contralaterales, presentando una mayor concentración de terminaciones en las láminas de la 3 a la 7 y una menor concentración en el asta ventral (Fig. 2C).

**Función:** Control del movimiento a través de sus terminaciones en la sustancia gris del asta ventral. Este control lo lleva a cabo principalmente mediante interneuronas, aunque también existen algunos axones corticoespinales que hacen contactos sinápticos directos con motoneuronas.

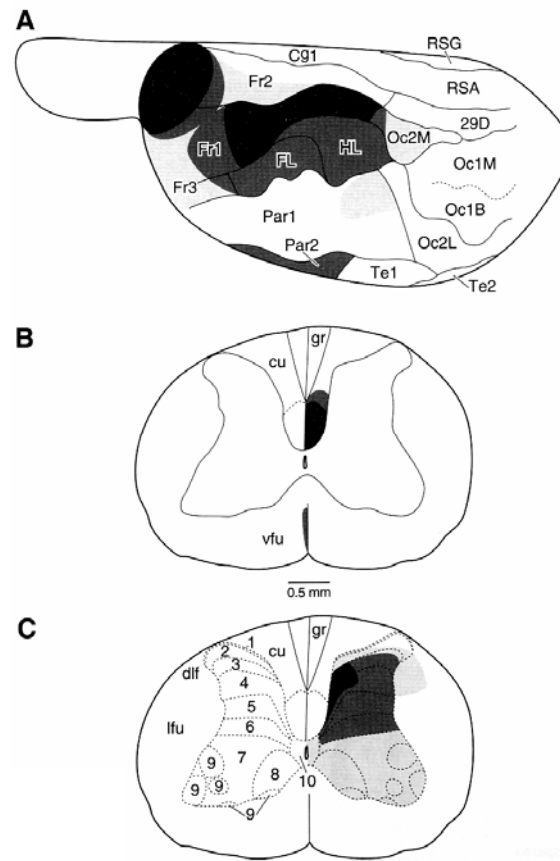


Figura 2. Tracto corticoespinal en la rata. A. Células de origen. Se muestra el aspecto dorsal de la corteza, con la nomenclatura de Zilles (Paxinos, 1995). Par1 + FL + HL constituyen la primera área somatosensorial, referida a menudo como SI, mientras que Par2 es equivalente a la segunda área somatosensorial, SII. Fr1 + Fr3 constituyen la corteza motora, mientras que Fr2 corresponde al área motora suplementaria. B. Curso de los axones corticoespinales. Nótese el tracto de axones directos en el cordón ventral (vfu). C. Terminación en la médula espinal (Paxinos, 1995).

### *Tracto rubroespinal*

**Origen:** Neuronas del núcleo rojo situado en el mesencéfalo en el tronco encefálico (RRF, Fig. 3A). Existe una organización somatotópica de este núcleo, de modo que la parte ventrolateral proyecta a la médula lumbar y la parte dorsomedial a la

médula cervical, aunque algunas neuronas del núcleo rojo proyectan a ambas partes de la médula.

**Localización medular:** La mayoría de los axones rubroespinales decusan en el mesencéfalo, nada más originarse, y en la médula espinal descienden contralateralmente por la parte dorsal del cordón lateral.

**Destino:** Los axones terminan en las láminas de la 5 a la 7, donde establecen sinapsis con neuronas excitadoras e inhibitoras.

**Función:** Principalmente la contribución al mantenimiento de la postura y al control motor durante la locomoción simple.

### *Tracto reticuloespinal*

**Origen:** Neuronas de la formación reticular del mesencéfalo (DpMe, Fig. 3A), protuberancia anular (PnC, PnV, Fig. 3B) y bulbo raquídeo (Gi, GiA, Fig. 3C).

**Localización medular:** Descienden bilateralmente por los cordones lateral y ventral.

**Destino:** Terminan en las láminas de la 3 a la 10.

**Función:** Papel importante en la iniciación de la actividad locomotora y en el mantenimiento de la postura, entre otras funciones.

### *Tracto rafeespinal*

**Origen:** Neuronas de los núcleos rafe magnus, rafe obscurus y rafe pallidus situados en la línea media a lo largo del tronco del encéfalo (RMg, Fig. 3B y C).

**Localización medular:** Los axones del rafe magnus descienden por el cordón dorsolateral de la ME. Los del rafe obscurus y pallidus descienden por la sustancia blanca ventrolateral.

**Destino:** Los axones del rafe magnus hacen sinapsis principalmente con neuronas del asta dorsal, con algunas terminaciones más dispersas también en el asta ventral. Los del rafe pallidus y obscurus terminan en el asta ventral, haciendo sinapsis con motoneuronas somáticas de la lámina 9, y también con neuronas preganglionares simpáticas en el núcleo intermediolateral.

**Función:** Los axones del rafe magnus están implicados en el control descendente del dolor, mientras que los del rafe pallidus y obscurus son responsables de efectos neuromoduladores de funciones motoras como la facilitación de la actividad locomotora rítmica.



*Tracto vestibuloespinal*

**Origen:** Las proyecciones vestibuloespinales nacen en el complejo vestibular situado en la protuberancia anular y el bulbo raquídeo, formado por los núcleos lateral, medial, espinal y superior (SpVe, MVe, Fig. 3C). La mayoría de axones que llegan hasta la región medular lumbosacra tienen su origen en el núcleo vestibular lateral, y los que llegan a la región torácica media nacen en el núcleo vestibular medial.

**Localización medular:** Sus axones viajan por el cordón ventral.

**Destino:** Principalmente hacen sinapsis con neuronas de las láminas 7 y 8 de las astas ventrales.

**Función:** Involucrados en el equilibrio postural y la locomoción en las ratas.

*Tracto coeruloespinal*

**Origen:** Lo originan las neuronas noradrenérgicas situadas en la parte posterior y externa de la sustancia gris que rodea el acueducto y cuarto ventrículo (Locus Coeruleus, LC, Fig. 3B).

**Localización medular:** Descienden por el cordón ventral de la ME.

**Destino:** Estos axones hacen sinapsis con las neuronas de las láminas de la 7 a la 10, incluyendo las motoneuronas de la lámina 9.

**Función:** Participan en la modulación de la actividad de las motoneuronas espinales. Están implicados, junto con el sistema simpático, en ofrecer una adaptación rápida a estímulos urgentes.

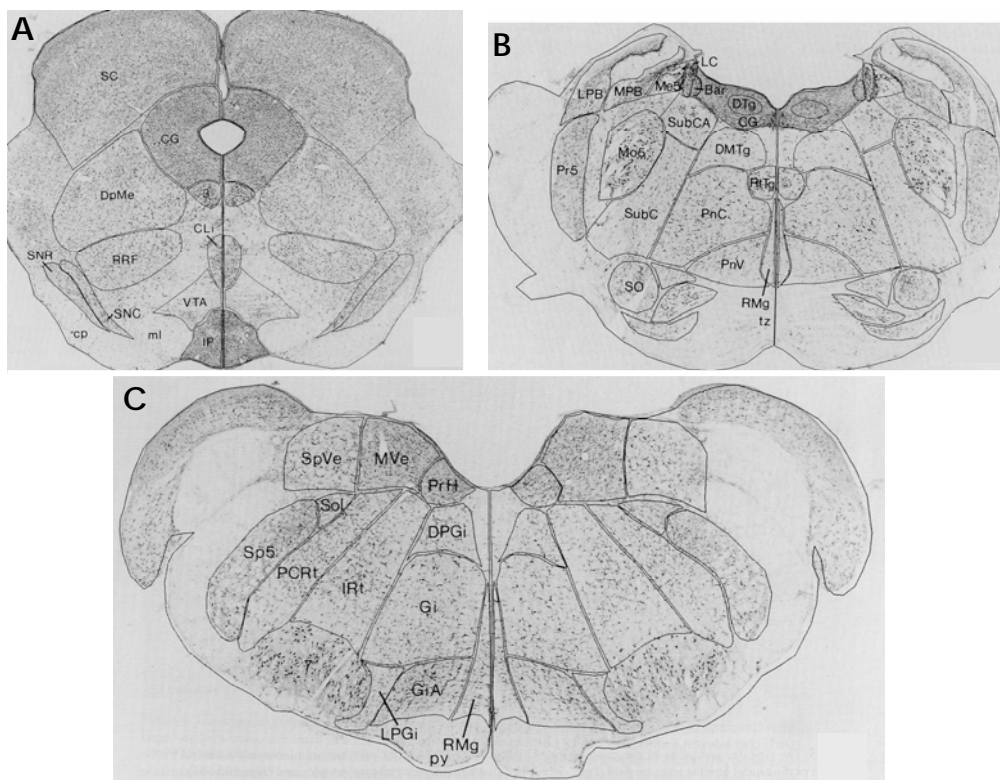


Figura 3. Esquema en el que se representan los núcleos neuronales más importantes en el mesencéfalo (A), protuberancia anular caudal (B) y bulbo raquídeo rostral (C) (Paxinos, 1995). Los principales núcleos que han sido analizados en el presente trabajo son: (A) RRF: campo retrorubral (Núcleo rojo), DpMe: formación reticular del mesencéfalo. CLi: núcleo lineal caudal del rafe; (B) LC: Locus coeruleus, PnC: formación reticular pontina, parte caudal, PnV: formación reticular pontina, parte ventral, RMg: núcleo rafe magnus; (C) Gi, GiA: formación reticular, RMg: núcleo rafe magnus, Mve: núcleo vestibular medial, SpVe: núcleo vestibular espinal.

### 1.2.2. Vías ascendentes:

En función de su área de terminación, los tractos ascendentes del **cordón ventrolateral** se agrupan en tres sistemas: Los espinotalámicos, que se originan en las láminas de la 2 a la 6 y que terminan en el tálamo, los espinoreticulares, con origen en las láminas 1, 5, 6, 7, 8 y principalmente 10 de la ME y que finalizan en la formación reticular del tronco del encéfalo y los espinocerebelosos que se originan

en las láminas de la 5 a la 7 y que terminan en el cerebelo y en núcleos relacionados con él. Los dos primeros tractos conducen sensibilidad termoalgésica, táctil no discriminativa y de presión, mientras que los últimos transmiten información propioceptiva no consciente.

Las vías del **cordón dorsal** contienen aferencias primarias de las raíces dorsales y axones de neuronas espinales. Las primeras forman la vía directa de los cordones dorsales que acaban en los núcleos Gracilis y Cuneatus del bulbo raquídeo. Desde aquí se proyectan axones al tálamo, donde hacen relevo para finalizar en la corteza somatosensorial. Las fibras del fascículo Gracilis se originan en los niveles sacro, lumbar, y torácico bajo (por debajo de T6); las del fascículo Cuneatus se originan en niveles torácicos altos (por encima de T6) y niveles cervicales, ambas vías se originan en las láminas de la 3 a la 7. Por esta vía se transmite información propioceptiva, así como la implicada en el procesamiento complejo como la discriminación táctil entre dos puntos (epicrítica), la vibración o la intensidad de la presión. Las fibras que proceden de las neuronas propioespinales forman la vía postsináptica del cordón dorsal, y en función de su localización medular sus axones hacen sinapsis con las neuronas del núcleo Gracilis (los axones de las neuronas espinales situadas en los segmentos lumbares), y con las del núcleo Cuneatus (las situadas en el engrosamiento cervical). En la rata la mayoría de las neuronas espinales que dan origen a esta vía se localizan en la lámina IV. Finalmente, las neuronas situadas en estos dos núcleos hacen sinapsis con los núcleos del tálamo. Por esta vía se procesa información nociceptiva y de tacto discriminativo (Paxinos, 1995).

### 1.3. Diferencias en la organización motora entre roedores, primates y humanos

Aunque el sistema motor es un sistema altamente conservado, en los vertebrados ha experimentado notables cambios evolutivos. Cabe destacar especialmente, la evolución de la corteza motora (presente únicamente en los mamíferos) y del tracto corticoespinal, que proyecta de manera extensa al tronco del encéfalo y a la médula espinal en primates, y puede ejercer su actividad sobre las neuronas motoras de forma directa o indirecta. La evolución de los primates ha supuesto un aumento en el tamaño relativo del neocórtex y en la extensión del área del neocórtex encargada de dar origen al tracto corticoespinal. También se

ha producido la aparición de un componente de conducción rápida del tracto corticoespinal, y la migración de la localización de los axones corticoespinales desde el cordón dorsal al cordón dorsolateral (Rouiller *et al.*, 1996). Las diferencias entre roedores y primates en cuanto al patrón de las terminaciones corticoespinales son tanto cualitativas como cuantitativas. En roedores, el haz corticoespinal proyecta principalmente a neuronas de las astas dorsales y a circuitos espinales pre-motores. En primates no-humanos, una porción importante del haz corticoespinal proyecta de forma masiva al asta ventral y hace sinapsis directamente con neuronas motoras, en particular con aquellas que inervan la musculatura de la mano. De acuerdo con esto, la estimulación de neuronas en la corteza motora, evoca respuestas en varias regiones de la médula espinal que difieren entre primates y roedores.

Esta evolución proporciona al SNC de primates la capacidad de reclutar grupos fraccionados de motoneuronas que inervan los músculos distales, permitiendo así el control único de la musculatura de la mano (Bortoff y Strick, 1993), con la aparición del control preciso de asir o agarrar entre el pulgar y el índice, que solo existe en primates. De acuerdo con esto, la interrupción del haz corticoespinal provoca un mayor fallo en el control fino de la función motora de las manos y los pies, en primates que en roedores (Lawrence y Kuypers, 1968; Courtine *et al.*, 2005), teniendo un efecto mayor todavía en los humanos (Nathan, 1994). Del mismo modo, la lesión en el tracto corticoespinal de roedores tiene un efecto pequeño sobre su capacidad de caminar (Muir y Webb, 2000), indicando que la corteza motora no es una estructura esencial para la sinergia de los músculos en la locomoción simple de esta especie. En cambio, la lesión en el haz corticoespinal en primates provoca algunos déficit permanentes durante la locomoción (Courtine *et al.*, 2005), y conduce a una discapacidad en las piernas en humanos, comprometiendo su capacidad de caminar (Nathan, 1994).

El control motor fino de las patas delanteras en los roedores puede ser evaluado, y se ve afectado cuando se lesiona el haz corticoespinal (Whishaw *et al.*, 1998). Sin embargo, la infraestructura neuromotora que subyace al control motor fino, y posiblemente a la locomoción, difiere tanto en naturaleza y en función entre roedores y primates. Cuando se compara roedores con primates no-humanos, las proyecciones del haz corticoespinal a los grupos de motoneuronas de los músculos

distales de las extremidades superiores e inferiores difiere sustancialmente, así como las marcadas diferencias en los detalles musculoesqueléticos de los dígitos distales (Courtine *et al.*, 2006).

Las diferencias existentes en la organización de la infraestructura neuromotora y el comportamiento motor asociado, sugieren que las estrategias promotoras de la regeneración del SNC podrían tener efectos diferentes sobre los sistemas neuronales de roedores y primates, resultando en una recuperación anatómica y funcional divergente.

También existen diferencias entre roedores y la mayoría de especies de primates en las distancias a las que los sistemas neuronales proyectan, o lo que es lo mismo, la distancia de regeneración requerida después de una lesión. Esta diferencia limita potencialmente la extrapolación de los resultados de estudios de regeneración o de plasticidad de roedores a primates. Por lo tanto, los diferentes tratamientos promotores de regeneración que han sido probados con éxito en roedores (véase apartado 6) deberían ser estudiados en primates no-humanos como paso previo a su traslado a la clínica (Courtine *et al.*, 2006).

## **II. La lesión traumática de la médula espinal y sus tipos**

La incidencia anual de lesiones en la médula espinal en los países desarrollados varía entre 11,5 y 53,4 por cada millón de habitantes, y las principales causas son los accidentes de tráfico, deportes y actividades de aventura, accidentes de trabajo, caídas domésticas y violencia (Tator, 1995). La mayoría de los accidentados son varones jóvenes de edades comprendidas entre 15 y 35 años. Los efectos que estos pacientes sufren a causa de su lesión, son devastadores y perduran a lo largo de toda su vida. El paciente presenta parálisis motora y pérdida de la sensibilidad de los segmentos corporales por debajo de la zona de la lesión así como disfunción intestinal, urinaria y sexual. Por ello necesitan, de forma crónica, la asistencia sanitaria y el cuidado de sus familiares, de modo que las lesiones medulares trascienden del plano personal, al familiar y estatal, presentando una gran repercusión socioeconómica.

El estudio con profundidad de la respuesta de la ME humana a las lesiones mediante técnicas de análisis de imagen, tinciones histológicas y mediante el estudio de material proveniente de autopsias, ha permitido grandes avances en el

conocimiento de los procesos que tienen lugar cuando se produce una lesión en la ME facilitando así la búsqueda de posibles terapias para este tipo de lesiones.

La lesión medular traumática puede ser producida por varios mecanismos de lesión primaria, los tres principales son: **contusión** (compresión aguda y transitoria de la médula espinal), **compresión masiva o maceración** (cuando la presión sobre la médula persiste a lo largo del tiempo) y **laceración** (debido a la intrusión en la médula de cuerpos extraños o fragmentos óseos). Las lesiones en la médula espinal varían desde diferentes grados de sección incompleta hasta la sección completa. El más común de todos estos mecanismos consiste en la combinación de un impacto seguido de una compresión persistente. Esta combinación de fuerzas mecánicas se produce en las fracturas bruscas, en las dislocaciones con fractura y en las roturas de disco.

### **III. Consecuencias de la lesión traumática de la médula espinal**

#### **III.1. Alteraciones histológicas**

##### ***III.1.1. Daño primario***

Tras una lesión traumática de cualquier tipo en la médula espinal, se produce en primer lugar una rotura de las membranas celulares de las neuronas, de la glía y de las células endoteliales debido al impacto inicial. Esto produce una zona de necrosis o muerte celular "no programada" que se localiza principalmente en el epicentro de la lesión y que es de carácter irreversible (Tator, 1995). También se produce una rotura de los axones debida al impacto, y la magnitud de la lesión axonal varía en función de la mayor o menor presencia de mielina (Blight, 1988). Los axones mielinizados son más vulnerables que los no mielinizados puesto que las fuerzas longitudinales de estiramiento de las fibras se concentran en los nódulos de Ranvier.

Como consecuencia de este daño primario, se produce la liberación de factores deletéreos y la estimulación de una respuesta inflamatoria con la subsiguiente liberación de moléculas neurotóxicas que conducen a una mayor muerte neuronal y a la pérdida progresiva de axones, lo que se conoce como "daño secundario" que describiré a continuación.

### III.1.2. *Daño secundario*

A nivel macroscópico, se produce una expansión de la zona hemorrágica que se produjo con el daño primario, y dichas hemorragias desaparecen aproximadamente tras 8 días de la lesión, apareciendo en su lugar una gran cantidad de restos celulares (Beattie *et al.*, 2002). A los 21 días post-lesión, la ME presenta una serie de pequeñas cavidades, que tras 14 semanas aproximadamente aparecen fusionadas dando origen a grandes regiones císticas. Estos quistes se encuentran rodeados por tejido cicatricial formado principalmente a partir de células gliales (Beattie *et al.*, 2002) (véase cicatriz glial). Cuando se produce una lesión por contusión se desencadena la formación de cavidades y quistes en las partes centrales de la médula, quedando parte de la sustancia blanca sin dañar y permaneciendo intacta la glía limitante externa. Tras una compresión, maceración o laceración se producen roturas sustanciales de la glía limitante y la piamadre, lo que favorece la proliferación de fibroblastos, conduciendo a la formación del tejido conjuntivo en el epicentro de la lesión, lo que se conoce como cicatriz fibrosa. En este tipo de lesiones la formación de quistes y cavidades es menos común (Moon y Bunge, 2005).

En estadios crónicos (dependiendo de la gravedad de la lesión), se observa macroscópicamente una atrofia de la ME que se expande rostro-caudalmente desde el sitio inicial de la lesión, debido principalmente a la degeneración Walleriana de los tractos ascendentes y descendentes (Tator, 1995) (véase más abajo).

A nivel microscópico se produce una serie de eventos patofisiológicos interrelacionados entre sí, que conducen tanto a la necrosis como a la apoptosis como mecanismos principales del daño secundario producido tras una lesión aguda (Beattie *et al.*, 2002):

**a) Muerte celular por necrosis y apoptosis.** Los mecanismos de daño secundario se inician con una ola necrótica rostro-caudal, que se origina en la zona de la lesión primaria. Esta ola de necrosis que se vuelve irreversible aproximadamente tras 8 horas, se expande aproximadamente hasta dos segmentos vertebrales por encima y por debajo de la lesión inicial (Profyris *et al.*, 2004). La muerte celular por necrosis se caracteriza por un hinchamiento de la célula, se produce una disrupción de los orgánulos citoplasmáticos, la lisis de la

membrana con la consecuente liberación del contenido intracelular, iniciando una respuesta inflamatoria local. Este tipo de muerte celular se puede considerar como un "homicidio", de manera que algún daño externo (determinados agentes tóxicos, cambios bruscos del entorno y/o alteraciones de las condiciones fisiológicas) puede alterar los mecanismos homeostáticos celulares, produciendo el daño de la membrana y los orgánulos, con la consecuente disminución en la producción de ATP, el hinchamiento pasivo de la célula y su disrupción.

La apoptosis es la muerte celular programada con activación de genes y dependiente de la síntesis activa de proteínas. Se caracteriza por la condensación del citoplasma y el núcleo y la rotura del DNA formando cuerpos apoptóticos, que son fagocitados sin llegar a producir respuesta inflamatoria. La apoptosis se puede considerar como una especie de "suicidio celular", en el que un determinado factor de estrés inicia una cascada de señalización intracelular. Estas vías de señalización intracelular conducen en último término a la activación de unos enzimas llamados caspasas, cuya diana son determinadas proteínas nucleares y del citoesqueleto, produciéndose la fragmentación celular. La apoptosis es un importante mediador del daño secundario tras una lesión medular (Beattie *et al.*, 2002) y produce su efecto en dos fases: una fase inicial en la que la apoptosis acompaña a la necrosis en la degeneración de múltiples tipos celulares y una fase posterior, que se localiza sobretudo en la sustancia blanca y que afecta fundamentalmente a los oligodendrocitos. Cronológicamente, la apoptosis ocurre inicialmente 6 horas después de la lesión en el epicentro de ésta y durante los días siguientes el número de células apoptóticas aumenta a un ritmo constante. Sin embargo, el número de células apoptóticas en esta zona disminuye tras una semana, y se produce un aumento de muerte apoptótica a cierta distancia de la lesión inicial que perdura durante varias semanas (Crowe *et al.*, 1997). Esto indica que podría haber una ventana temporal durante la cual este proceso de muerte por apoptosis podría ser reversible por ejemplo, mediante la aplicación de inhibidores farmacológicos de caspasas (Kwon *et al.*, 2004).

Tanto la necrosis como la apoptosis pueden ser provocadas por los mismos factores externos como son la isquemia, el estrés oxidativo o la excitotoxicidad, aunque cuanto más severo es el daño, más probabilidades hay de que la célula muera por necrosis (Kwon *et al.*, 2004; Profyris *et al.*, 2004).



**b) Isquemia.** Inmediatamente después del impacto (daño primario) la lesión vascular de arteriolas, capilares y vénulas limita el flujo sanguíneo a la ME. Poco tiempo después, este episodio de infarto se intensifica debido a los mecanismos de lesión secundaria como los vasoespasmos, trombosis o el shock neurogénico que causa bradicardia, hipotensión, disminución de la resistencia periférica y de la potencia cardíaca (Profyris *et al.*, 2004). A nivel celular se produce una pérdida de las rutas de fosforilación oxidativa y glucolítica que conducen a la falta de producción de ATP. Como consecuencia de la falta de ATP, la célula inicia los mecanismos de necrosis como son la pérdida de permeabilidad de la membrana, liberación de contenido lisosomal y activación de enzimas autodestructivos calcio-dependientes. Estos enzimas incluyen proteasas, fosfolipasas, ATPasas y endonucleasas que degradan los componentes nucleares, citoplasmáticos y de membrana (Tator, 1995).

**c) Excitotoxicidad.** Como consecuencia de la lesión medular se produce también un aumento extracelular de glutamato, alcanzando niveles tóxicos tras 15 minutos en modelos experimentales de lesión. Este aumento de glutamato es provocado por una disminución en la capacidad de reabsorción de glutamato, por la exocitosis de calcio dependiente de vesículas sinápticas de glutamato y por la liberación del glutamato intracelular debido a la lisis celular (Panter *et al.*, 1990). Esta abundancia de glutamato extracelular, especialmente en condiciones de hipoxia, produce una sobre-estimulación de los receptores ionotrópicos de glutamato (NMDA, AMPA y kainato) conduciendo a una oleada de muerte celular por excitotoxicidad (Doble, 1999).

**d) Formación de especies reactivas de oxígeno (ROS).** Durante la isquemia, determinados enzimas de las células endoteliales sufren una proteólisis limitada, lo que provoca la aparición de enzimas modificados, capaces de transferir electrones al oxígeno molecular. Una vez se recupera el aporte sanguíneo pocos días después de la lesión, la reexposición de las células endoteliales al oxígeno conlleva la reacción enzimática que produce la aparición de radicales libres. Estas ROS son un potente estímulo de muerte celular mediante la peroxidación de sus lípidos y la modificación de proteínas y ácidos nucleicos (Profyris *et al.*, 2004).

**e) Reacción inflamatoria.** La respuesta inflamatoria e inmunológica que se produce después de una lesión medular es iniciada por células inmunes periféricas

(macrófagos, neutrófilos y células T) y células gliales activadas (astrocitos y microglía) que proliferan o migran en la zona de la lesión después del daño (Popovich *et al.*, 1997; Keane *et al.*, 2006). Además también están implicados componentes no celulares como las citoquinas, prostaglandinas y el complemento (Kwon *et al.*, 2004). Tras una lesión medular, la zona de la lesión es rápidamente invadida por neutrófilos sanguíneos, que secretan enzimas de lisis y citoquinas que provocan un mayor daño local y el reclutamiento de más células inflamatorias (Popovich *et al.*, 1997). Los monocitos/macrófagos sanguíneos son también reclutados, al mismo tiempo que la microglía residente se activa y ambos invaden la zona para fagocitar el tejido lesionado (Dusart y Schwab, 1994). Estas y otras células reactivas producen citoquinas, como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleuquinas e interferones, que median la respuesta inflamatoria y pueden contribuir a un mayor daño en el tejido (Bartholdi y Schwab, 1997; Klusman y Schwab, 1997). Las citoquinas facilitan la respuesta inflamatoria en el SNC induciendo la expresión de citoquinas adicionales, quimioquinas, óxido nítrico (NO), y oxígeno reactivo (Keane *et al.*, 2006).

De todas las citoquinas implicadas en el daño secundario tras una lesión en el SNC, el TNF- $\alpha$  es quizás el más estudiado. Este puede ser producido por gran cantidad de células incluyendo los neutrófilos, macrófagos, microglía, astrocitos y células T, y se acumula rápidamente en el lugar de la lesión (Yan *et al.*, 2001). Su rápida liberación promueve una mayor migración de leucocitos sanguíneos activados, lo que estimula la producción adicional de citoquinas. En determinados estudios animales el TNF- $\alpha$  ha demostrado tener tanto propiedades neurotóxicas (Yan *et al.*, 2001) como neuroprotectoras (Cheng *et al.*, 1994). Por otro lado, los macrófagos que invaden rápidamente la zona de la lesión para fagocitar los restos de tejido, tradicionalmente han sido relacionados con una mayor destrucción del tejido neural (Blight, 1985). Sin embargo, recientemente se ha sugerido que la capacidad de regeneración que se observa en el SNP podría estar relacionada con la mayor invasión de macrófagos que se produce en este sistema; (Rapalino *et al.*, 1998; Schwartz y Yoles, 2006). Esto refleja la gran complejidad de la respuesta inflamatoria e inmune tras una lesión medular, y explica en parte, el hecho de que el proceso inflamatorio producido tras la lesión sea considerado como una “espada de doble filo”. Actualmente se tiende a aceptar que las fases tempranas

de la inflamación son de naturaleza deletérea mientras que los eventos que tienen lugar más tardíamente parecen ser protectores (Kwon *et al.*, 2004).

**f) Edema.** Muy poco tiempo después de la lesión se observa también la aparición de un edema. El edema es consecuencia, fundamentalmente, de un aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos alrededor de la zona lesionada debido, entre otros factores, al aumento de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Este edema o hinchazón debido al aumento de líquidos, puede aumentar el daño tisular por la compresión del tejido contra vértebras fracturadas (Hagg y Oudega, 2006).

**g) Disrupción axonal y degeneración Walleriana.** La degeneración Walleriana o anterógrada se produce tras una lesión por axotomía y consiste en una disrupción y posterior desaparición de la parte del axón que se encuentra distal a la lesión con respecto al soma. Por lo tanto, en el caso de los fascículos descendentes se produce en los axones situados en el muñón medular caudal y en los fascículos ascendentes en el muñón rostral. Aproximadamente, 15 minutos tras la lesión se produce una hinchazón periaxonal en la parte distal de los axones y, en ellas, y en el caso de las fibras mielinizadas, se observa la separación de las láminas de mielina produciéndose una ruptura de la mielina y tras 24 horas se puede observar el contenido axonal en el espacio extracelular tanto en los axones mielinizados como en los no mielinizados. Los axoplasmas neuronales sufren una transición; muestran una apariencia granular con una desordenación de sus neurofilamentos y en muchos axones se observa la abundancia inusual de organelas intracelulares (Anthes *et al.*, 1995). Estos cambios axonales van acompañados por la degeneración Walleriana, que se suele iniciar aproximadamente 3 días después de la lesión (Profyris *et al.*, 2004). En resumen, el término “degeneración Walleriana” describe la desaparición de segmentos axonales separados de su soma neuronal por la lesión. El proceso comienza con la degeneración de fibras por separado, acompañado de la fragmentación de su mielina asociada. Continúa con la acumulación de fragmentos residuales y culmina con la fagocitosis de esos restos por macrófagos y microglia (Profyris *et al.*, 2004).

Además, en los lugares de degeneración también aparecen áreas de apoptosis tardía. Esto tiene importantes implicaciones ya que muchas de las células

que están muriendo son oligodendrocitos que han perdido el soporte trófico que les proporcionaban los axones dañados con los que estaban asociados (Warden *et al.*, 2001).

**h) La cicatriz glial y células inhibitoras.** Al igual que en otras lesiones del SNC, las lesiones medulares provocan una gliosis reactiva, y las principales células implicadas son células gliales (los astrocitos, la microglía y los precursores de oligodendrocitos que migran al lugar de la lesión) y, en menor medida, células no gliales (células meníngicas y algunas células madre que también migran). La cicatriz glial es una estructura mixta en la que las diferentes células llegan a la zona lesionada y participan a diferentes tiempos. En general, estas células migran al área lesionada para fagocitar restos tisulares y también para formar una “pared” que limite la expansión de mecanismos dañinos secundarios. Sin embargo, este mecanismo va acompañado de un depósito masivo de moléculas en la propia cicatriz que inhiben el crecimiento axonal (Fawcett y Asher, 1999).

**Oligodendrocitos:** El trauma daña directamente las envueltas de mielina, apareciendo inmediatamente restos de mielina en la zona lesionada. Estos restos son eliminados lentamente por la microglía, pero este proceso tarda varias semanas. Algunos de los oligodendrocitos mueren, pero otros sobreviven y por tanto las cicatrices gliales, en las áreas de sustancia blanca, suelen contener generalmente oligodendrocitos y, durante algún tiempo, restos de mielina (Perry y Gordon, 1988) .

**Microglía/macrófagos:** Este componente inicial es seguido por la activación y la migración de microglía (tras 48h), que también va acompañado por la invasión de macrófagos. En el tejido nervioso normal, la microglía se encuentra en estado quiescente, con prolongaciones ramificadas muy cortas. Tras una lesión estas células experimentan una serie de cambios que incluyen su activación, se empiezan a dividir y migran a la zona de la lesión (revisado en Kreutzberg, 1996). De modo que muy poco tiempo después de la lesión se produce un influjo de microglía activada que va adquiriendo una morfología tipo macrófago con el tiempo. Además, en las lesiones de la ME se produce un daño vascular, con el consiguiente reclutamiento de macrófagos provenientes de la sangre. Por lo tanto, se mantiene un elevado número de células microgliales y macrófagos en la zona lesionada durante semanas (Fawcett y Asher, 1999).

Hasta este momento (periodo cuya duración depende del grado y el tipo de lesión), la composición de la cicatriz glial, a excepción de los restos de mielina, es permisiva al crecimiento axonal. A partir de este punto, la cicatriz empieza a estar dominada por componentes que bloquean el crecimiento axonal (Fawcett y Asher, 1999).

**Precursores de oligodendrocitos:** En el SNC normal existen precursores de oligodendrocitos que presentan el proteoglicano NG2 y el receptor  $\alpha$  del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR  $\alpha$ ) en su superficie (Levine, 1994). Estas células son reclutadas en gran número cuando se produce una lesión traumática. En primer lugar aumentan la intensidad de la tinción de NG2 en su superficie, y posteriormente se acumulan en gran número en la zona de la lesión mediante división celular y migración. El número de estas células alcanza su pico máximo tras 7 días aproximadamente, permaneciendo en el mismo lugar durante semanas (Levine, 1994).

**Células meníngicas:** En este mismo punto temporal, también migran a la cicatriz glial células meníngicas (fibroblastos) de la superficie lesionada del SNC. Estas células acuden con la finalidad de restaurar la interrumpida glia limitans que rodea el SNC, haciendo contacto con astrocitos y delimitando así la lesión primaria (Fawcett y Asher, 1999).

**Células progenitoras multipotenciales:** Inmediatamente después de la lesión, células progenitoras multipotenciales del canal espinal central también invaden también la zona de la lesión primaria (Profyris *et al.*, 2004).

**Astrocitos:** La formación de la cicatriz glial se inicia y finaliza con la migración y proliferación de astrocitos. En el SNC normal, la mayoría de los astrocitos de la sustancia gris presentan la morfología clásica, con parte de la célula en contacto con vasos sanguíneos y muchas prolongaciones finas entremezcladas con los somas y ramificaciones neuronales. El primer evento que se produce después de la lesión traumática es la muerte celular ocasionada por la propia disrupción mecánica de la zona, pero durante los días siguientes la lesión se expande (Dusart y Schwab, 1994). Se produce en primer lugar una reacción astrocítica, caracterizada por el aumento en la expresión de la proteína ácida de los filamentos gliales (GFAP), que en ratas se extiende hasta 1cm desde la zona de la lesión (Eng *et al.*, 1987).

Los astrocitos que participan en la formación de la cicatriz son probablemente los más próximos a la lesión (Fawcett y Asher, 1999). La secuencia exacta de eventos depende de la magnitud de la lesión y en particular del número de células que necesitan ser reemplazadas para recrear el borde astrocítico alrededor de la zona lesionada o para rellenar la zona con astrocitos. Los astrocitos en contacto con la zona de la lesión aumentan la producción de vimentina y nestina, y se empiezan a dividir. También se producen otros cambios bioquímicos: incremento en la producción de factores tróficos, citoquinas, inhibidores de proteasas, moléculas de superficie celular, matriz y otras moléculas, (Dusart *et al.*, 1991; Eddleston y Mucke, 1993; Merrill y Benveniste, 1996; Ridet *et al.*, 1997). Un evento temprano que influye la respuesta astrocítica es la invasión de la lesión por células meningeas, estableciéndose una nueva *glia limitans* en la interfase entre estas células y los astrocitos supervivientes (Fawcett y Asher, 1999). Los astrocitos alrededor de este área sufren una hipertrofia, desarrollan muchas prolongaciones finas y algunos se dividen. Además los astrocitos tratan de reestablecer la integridad del sistema dañado para conservar el funcionamiento de aquellos circuitos no dañados y para ello regulan la barrera hematoencefálica, la concentración de aminoácidos excitadores, las concentraciones iónicas y secretan factores tróficos y citoquinas. Estos astrocitos son también los principales productores de la mayoría de moléculas inhibitoras del crecimiento axonal. El resultado final es un tejido predominantemente astrocítico altamente empaquetado, con astrocitos filamentosos que presentan muchas de sus prolongaciones formando uniones "gap" con las de sus vecinas (Fawcett y Asher, 1999).

Como resultado de la rotura de la barrera hematoencefálica se produce también la migración de fibroblastos a la cicatriz glial. En estadios subagudos (3 semanas aproximadamente) incluso pueden migrar algunas células de Schwann que son capaces de remielinizar los axones desnudos (Profyris *et al.*, 2004).

Además de la barrera mecánica que supone la presencia de todas estas células al crecimiento axonal, también existe una barrera molecular ejercida por una serie de moléculas capaces de producir el colapso de los conos axonales de crecimiento.

i) **Moléculas inhibidoras del crecimiento axonal.** En general, las moléculas inhibidoras cuya expresión aumenta tras una lesión se pueden dividir en dos categorías: (1) moléculas inhibidoras asociadas a mielina y (2) moléculas sintetizadas por los componentes celulares de la cicatriz glial, que pueden permanecer en la superficie de estas células o pueden ser secretados en la matriz extracelular.

(1) Inmediatamente después del daño primario, los fragmentos resultantes de mielina dejan expuestas moléculas inhibidoras del crecimiento axonal como son las glucoproteínas asociadas a mielina (MAG), Nogo-A y glucoproteínas de la mielina de los oligodendrocitos (OMgp) (Caroni *et al.*, 1988; Caroni y Schwab, 1988a; McKerracher *et al.*, 1994; Mukhopadhyay *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2000; GrandPre *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002a). Estas tres proteínas se localizan fundamentalmente en las capas más internas de las envueltas de mielina en contacto directo con los axones (Profyris *et al.*, 2004). La inhibición del crecimiento axonal por estas moléculas asociadas a mielina se produce cuando consiguen unirse a los receptores adecuados en los conos de crecimiento. El receptor NgR juega un papel crucial debido a su capacidad de unirse a las tres moléculas inhibidoras asociadas a mielina (Fournier *et al.*, 2001). Existe una serie de co-receptores de NgR que participan en la regulación de la regeneración axonal como son p75, LINGO1 o TAJ/TROY (Wang *et al.*, 2002a; Shao *et al.*, 2005). Una vez se produce la unión de estas moléculas inhibidoras a los receptores adecuados, se desencadena una serie de cascadas de señalización que consiguen, en último término, el colapso de estos conos de crecimiento.

(2) En cuanto a las moléculas inhibidoras sintetizadas por las células de la cicatriz glial, los proteoglicanos son una de las familias más importantes. Dentro de esta familia, el subgrupo de los proteoglicanos condroitín sulfato es el de mayor poder inhibitor. La mayoría de estas moléculas son producidas por los astrocitos de la cicatriz (Bovolenta *et al.*, 1997), sin embargo, las células precursoras de oligodendrocitos y las células menígeas también producen una parte de ellos (Fawcett y Asher, 1999). Los miembros de este subgrupo entre los que se encuentran el NG2, neurocan, versican, brevican y fosfocan, inhiben el crecimiento de las neuritas mediante su unión a la molécula promotora de crecimiento laminina, impidiendo entonces su interacción con las integrinas receptoras del

cono de crecimiento (Gates *et al.*, 1996; Margolis y Margolis, 1997; Morgenstern *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2003).

Existe otro tipo de moléculas inhibidoras sintetizadas por las células de la cicatriz que pueden tener efectos inhibidores o promotores del crecimiento. Dentro de esta categoría se encuentran las tenascinas (tenascina-R, tenascina-C y tenascina-X), las netrinas y las semaforinas. La expresión de tenascinas aumenta en el SNC dañado y están asociadas a astrocitos y células meníngeas. Además de sus efectos inhibidores sobre el crecimiento axonal, poseen sitios de unión para muchos de los proteoglicanos condroitín sulfato mencionados anteriormente. Puesto que muchos de estos proteoglicanos no permanecen unidos a la superficie celular, su posible unión a tenascina puede determinar el que permanezcan retenidos en la matriz extracelular de la cicatriz glial (Rauch *et al.*, 1997). Las netrinas y semaforinas, además de su efecto inhibidor, actúan como moléculas guía durante el desarrollo (Grimpe y Silver, 2002).

### **III.2. Fases de la lesión traumática**

En base a los cambios histológicos y moleculares que se producen tras una lesión traumática de la ME, se pueden diferenciar tres etapas consecutivas (Kirshblum, 2002; Ahn *et al.*, 2006):

**III.2.1. Fase aguda:** Esta fase hace referencia a las primeras horas después de la lesión. Incluye los cambios que se producen en el sistema microvascular de la sustancia gris durante los primeros minutos. Entre las 4 y 8 horas siguientes aparecen aneurismas y rotura arterial en las columnas laterales, y en 24 horas aparecen microtrombos en los capilares. Debido al reducido flujo sanguíneo, también durante estas primeras horas se producen los cambios necróticos en la sustancia gris que afectan tanto a neuronas como a glía. En la sustancia blanca aparecen vacuolas en las envueltas de mielina, y los axones se dilatan o se rompen, mostrando una apariencia esponjosa al microscopio electrónico (Kirshblum, 2002). Todo esto se traduce en un fallo general del funcionamiento del SNC, produciéndose el shock medular (véase apartado 3.c.) que se prolonga durante algunos días en animales experimentales y durante semanas en humanos (Ahn *et al.*, 2006).

**III.2.2. Fase subaguda:** Esta fase se caracteriza por la presencia de las diferentes poblaciones celulares que van acudiendo a la zona de la lesión. Como



ya expliqué anteriormente, la microglía y los astrocitos de la zona de la lesión se activan y se dividen. En pocas horas también se produce el reclutamiento de células inflamatorias como los neutrófilos, los monocitos y los macrófagos. Todas estas células contribuyen, entre otras cosas, a la fagocitosis de los restos tisulares, con la consiguiente aparición de cavidades de tamaños variables. Se produce un aumento en la producción de radicales libres, una excesiva liberación de neurotransmisores excitadores y reacciones inflamatorias. El estrés oxidativo juega un papel importante en la patofisiología de la lesión medular, contribuyendo a él factores como la isquemia y la generación de radicales libres por la microglía activada durante la fagocitosis. La muerte celular apoptótica se extiende desde días hasta años después de la lesión. En esta fase se forma también la cicatriz glial y se produce la degeneración Walleriana. Todos estos factores contribuyen a los déficit en la conducción nerviosa (Kirshblum, 2002; Ahn *et al.*, 2006).

**III.2.3. Fase crónica:** Tanto la fase aguda como la subaguda son etapas muy inestables, en las que se suceden cambios de forma continuada en la composición celular y molecular de la zona lesionada. Se considera fase crónica al estado de la lesión más estable, a partir del cual ya no se espera observar grandes cambios histológicos ni funcionales en el individuo lesionado. El intervalo de tiempo a partir del cual una lesión alcanza su estado crónico depende del tipo de lesión y del propio individuo. En animales de experimentación, aproximadamente a partir del tercer mes, las células inflamatorias han desaparecido, tampoco queda rastro del edema inicial y los pequeños quistes que se fueron formando aproximadamente un mes después de la lesión, aparecen rodeados por tejido cicatricial y adquieren una forma perfectamente delimitada (Hill *et al.*, 2001). En cuanto a la expresión genética en el epicentro de la lesión, entre 1 y 3 meses post-lesión se produce un retorno progresivo al perfil genético observado en médulas sin lesionar y que se perdió inmediatamente después del daño. Se vuelven a expresar genes relacionados con neurotransmisores, receptores y enzimas sintetizadores involucrados en sinapsis. También aumenta la expresión de transcritos implicados en soporte metabólico, especialmente en producción energética mitocondrial, en glicólisis y en el metabolismo del lactato, aunque no se expresan a niveles tan altos como en las médulas intactas (Velardo *et al.*, 2004). A nivel macroscópico, se produce un considerable adelgazamiento dorsoventral de la zona de la lesión.

### **III.3. Consecuencias funcionales tras una sección completa de la médula espinal.**

El modelo de lesión medular elegido para nuestro estudio es el de sección completa de la médula espinal en mamíferos adultos, por ello, en este apartado me centraré en el análisis de las consecuencias funcionales que este tipo de lesión acarrea en humanos. Cada año, unas 20 personas de cada millón, o lo que es lo mismo, aproximadamente 800 personas en España sufren lesiones completas de la ME, lo que les provoca una pérdida total de la sensibilidad y del movimiento voluntario por debajo del nivel de la lesión, y una pérdida del control voluntario de la función de los esfínteres rectal y vesical. Tras una lesión completa de la médula espinal se produce una fase inicial que se conoce como shock medular que describe la supresión de las funciones nerviosas. Está causado por la interrupción de las fibras ascendentes y descendentes (motoras, sensitivas y autónomas), con afectación temporal de la actividad refleja, parálisis muscular y visceral y pérdida de la sensibilidad por debajo del nivel de la lesión. Se produce por tanto:

- Parálisis flácida y arrefléxica infralesional (tetraplejía en lesión cervical; paraplejía en lesión torácica o lumbar).
- Pérdida de la sensibilidad infralesional (anestesia).
- La afectación del sistema autónomo da lugar a parálisis vesical, con retención urinaria. íleo paralítico, con distensión abdominal y estreñimiento. Y complicaciones vasomotoras, con falta de respuesta venosa y arterial, causando hipotensión, hipotermia y bradicardia (Kirshblum, 2002).

En un paciente con lesión medular, la presentación inicial del shock medular, es la hipotensión, causada por la pérdida del tono vasomotor, que produce disminución del retorno venoso y de la contractilidad arterial, lo que da lugar a vasodilatación y disminución de la resistencia vascular sistémica.

Esta fase puede durar desde varios días (en individuos jóvenes) hasta varias semanas (Kirshblum, 2002). Pasada la fase de shock medular la actividad refleja retorna a las zonas por debajo de la lesión. Como consecuencia de la interrupción del tracto corticoespinal se produce una hiperreflexia, clonus (contracción y relajación rápida y repetida de los músculos) y en humanos se produce un signo de Babinski (reflejo que se produce en los dedos del pie en los lesionados medulares al tocar la planta con un objeto punzante). Las piernas se tornan espásticas, condición que suele ir precedida por una hipertonia intermitente y

espasmos flexores que ocurren espontáneamente o provocados por estímulos cutáneos. Posteriormente se produce una alternancia de espasmos flexores y extensores que finalmente terminan fijando una postura de flexión o extensión de las rodillas y cadera. La parálisis espástica bilateral se produce por la interrupción de los fascículos descendentes extrapiramidales.

Como consecuencia del daño causado a las neuronas en las astas anteriores y a las raíces del mismo segmento se produce una parálisis bilateral de la neurona motora inferior en el segmento de la lesión, lo que va produciendo una atrofia muscular progresiva, más acentuada pasado tiempo.

Se mantiene también la pérdida bilateral de todas las sensaciones por debajo de la lesión. La pérdida de discriminación táctil y el sentido vibratorio y propioceptivo se debe a la destrucción bilateral de los fascículos ascendentes en los cordones posteriores. La pérdida del dolor, la temperatura y el tacto leve se originan por la interrupción de los fascículos espinotalámicos lateral y anterior de ambos lados. Dado que estos fascículos cruzan de forma oblicua, la pérdida de las sensaciones térmicas y el tacto leve tiene lugar dos o tres segmentos debajo de la lesión.

La función de la vejiga y del intestino se vuelven automáticas, con un reflejo de vaciado en respuesta al llenado moderado. El vaciado automático de la vejiga suele producirse con cierto retraso debido a la distensión severa de la vejiga y a posibles infecciones producidas en la etapa aguda (Kandel, 1985; Kirshblum, 2002).

#### **IV. Cuidados y pautas de tratamiento en pacientes con lesión medular completa**

La lesión medular es una enfermedad multidisciplinaria, en cuyo tratamiento debe existir una estrecha colaboración de médicos de urgencia, rehabilitadores, ortopedistas, etc. Esta colaboración ha dado lugar a un descenso significativo de la mortalidad, a pesar de la existencia de lesiones muy altas, (por encima de C7). Otro factor que ha llevado a esta disminución de la mortalidad, es la concienciación de que el tratamiento hay que iniciarlo cuanto antes, intentando evitar o mitigar la aparición de fenómenos fisiopatológicos capaces de aumentar secundariamente la lesión inicial.

Inmediatamente después de producirse la lesión medular, se deben llevar a cabo una evaluación y un tratamiento de urgencia, que se desarrollan en el lugar del accidente y que van enfocados al mantenimiento de las funciones vitales del paciente y a su estabilización y transporte.

Una vez en el hospital, durante la fase de shock medular están implicados muchos órganos y sistemas a tener en cuenta. Además, después del shock medular, durante la llamada "fase de estado", el paciente también requiere de unos cuidados y tratamientos diarios. A continuación describiré las principales pautas y tratamientos a seguir tanto en condiciones normales como si aparecen complicaciones (Santos-Benito *et al.*, 2006):

1. Aporte de fluidos. Téngase en cuenta, que en realidad no existe hipovolemia, sino una falta de tono vascular. El indiscriminado aporte de líquidos, puede producir una sobrecarga de volumen.

2. Puede ser necesaria la utilización de drogas  $\alpha$ -adrenérgicas, para restaurar la vasoconstricción y la resistencia sistémica vascular. Las más utilizadas son: Efedrina, Fenilefedrina y Metoxamina.

3. Vigilancia del shock hipovolémico asociado. Una hipotensión inferior a 55-60 mm. de Hg. es peligrosa ya que disminuye la perfusión de los órganos, de manera que puede agravar la lesión medular. Debe tratarse, si se presenta, con expansores de plasma (Dextrano), concentrados de plasma o sangre total. Siempre monitorizando y controlando la diuresis cada hora.

Otros controles a realizar: Radiografías de tórax y abdomen, analítica de orina y hematocrito-hemoglobina.

Las complicaciones de la sobrecarga de volumen son: hipertensión arterial, fallo cardíaco, edema pulmonar y periférico.

4. Depresión respiratoria. Puede ser causa de muerte al principio. La afectación diafragmática (C3-C4-C5), de los músculos intercostales (lesión torácica) y de los abdominales (lesión torácico-lumbar), son causa grave de depresión respiratoria, por lo que es fundamental el control y tratamiento desde el inicio de la lesión. El sistema respiratorio está involucrado invariablemente en lesiones medulares cervicales.

5. Función urinaria. Las vías voluntarias y reflejas se encuentran abolidas, con parálisis del detrusor, de las fibras estriadas y de los músculos uretrales. Están

cerrados los esfínteres interno y externo, lo que produce una distensión vesical y orina por rebosamiento si no se realiza un vaciado regular. El tratamiento consiste en colocar un sondaje vesical permanente, que será sustituido por sondajes intermitentes cuando se resuelva el shock espinal. Así se previene la infección urinaria, se controla la diuresis y el volumen residual, y se ayuda a mantener el tono muscular intrínseco de la vejiga, para el restablecimiento de la actividad refleja vesical. Como en los roedores no se puede colocar una sonda vesical permanente se realizan vaciados diarios de la vejiga para evitar la distensión y que queden volúmenes residuales de orina que favorezcan las infecciones (Santos-Benito *et al.*, 2006).

El mantenimiento de la función vesical, ayuda a prevenir la hiperplasia intravesical, que causa hidronefrosis, y precipita el fallo renal. También, el adecuado vaciamiento vesical, ayuda a disminuir la incidencia de cálculos vesicales.

6. Sistema gastroduodenal. Existe atonía gástrica e intestinal. Se puede producir un íleo paralítico, con distensión abdominal (se suelen hacer rutinariamente radiologías de abdomen). La atonía gástrica puede producir vómitos, y éstos neumonías por aspiración. Podría producirse estreñimiento e impactación fecal por atonía del colon y afectación de los reflejos que controlan la defecación. Cuando disminuye el tono del esfínter, puede producirse incontinencia fecal. También se puede producir hemorragia gástrica, producida por úlceras de estrés, evolucionando, en los casos más graves, hacia la perforación y peritonitis.

Tratamiento de las alteraciones gastro-intestinales:

- Reposo absoluto del sistema hasta que se resuelva la atonía.
- Sonda nasogástrica.
- Sonda rectal.

Estas maniobras que se realizan en clínica no es posible realizarla en los animales de laboratorio.

7. Alteraciones vasculares. El éxtasis vascular puede producir trombosis, que podría embolizar, produciendo tromboembolismo pulmonar. Si esto se produjera, habría edema periférico favorecido por la inmovilidad de las extremidades. Uno de los síntomas que hay que tener muy en cuenta es la hipotensión arterial que puede producirse por parálisis vasomotora, esto conlleva a una falta de respuesta del

sistema vascular a los cambios de posición, con lo que se podría producir una hipotensión ortostática cuando se coloca al paciente en posición vertical. La vasodilatación que se origina produce inflamación de partes blandas y enrojecimiento de la piel en la parte infralesional.

Tratamiento de las alteraciones vasculares:

- Anticoagulantes (mediante administración de heparina)
- Medias antiembólicas en las extremidades
- Cinesiterapia precoz
- Cambios posturales reglados (cada 45 minutos).

8. Alteración de la termorregulación y de la sudoración. La piel aparece seca, enrojecida y caliente. Para evitar que esto se produzca debe mantenerse una temperatura ambiente de unos 21-22 grados, abrigar al enfermo si presenta hipotermia, y refrescarle si presenta hipertermia.

Como ya se mencionó anteriormente, el shock medular no es un estado permanente, puede durar entre días y meses. El retorno de la función basal se hace de caudal a proximal. En personas los primeros reflejos que aparecen son el bulbocavernoso y los plantares y en los monos el patelar primero y el cremastérico después. La parálisis flácida del principio pasa a ser espástica cuando aumenta el tono por debajo del nivel de la lesión.

Cuando finaliza la fase de shock, las funciones autonómicas vesicales vuelven a la normalidad, con evacuación refleja secundaria a la dilatación de la vejiga. Este vaciamiento puede ser disparado por estímulos no relacionados (fricción del pie, rascando abdomen...). En primates suele aparecer tras tres semanas, y en roedores tras dos. En lesionados cervicales persiste durante mucho tiempo un estado de autonomía refleja que hace que ante determinados estímulos estos pacientes presenten cuadros clínicos muy característicos y a veces espectaculares para las personas no familiarizadas con este tipo de lesiones.

Entre las complicaciones más comunes que sufren los lesionados medulares se encuentran las infecciones de orina, pudiendo ocasionar, en caso de no ser tratadas adecuadamente, afectación renal, fallos renales e incluso la muerte del paciente. Cuando se produce una infección urinaria los tratamientos a seguir dependiendo del tipo de infección son:

Tracto urinario inferior (sin fiebre)

- con sedimento normal: no tratamiento.
- con sedimento alterado (piuria, nitritos positivos...), tratar según antibiograma: quinolonas, cefalosporinas, amoxicilina-clavulánico, fosfomicina. En roedores administramos amoxicilina-ácido clavulánico.

Tracto urinario superior (con fiebre)

- Poner sonda vesical permanente (esto no es posible en roedores).
- Cursar urocultivo y sedimento (esto no lo hacemos en roedores).
- Cursar hemocultivo y hemograma urgente (esto no lo hacemos en roedores). En espera de resultados: Tobradistin y Zinnat o Curoxima.
- Si se dispone de resultado de urocultivo y antibiograma, seguir tratamiento según sensibilidad.

En nuestro laboratorio, hemos puesto a punto toda una serie de protocolos, tomando como referencia los utilizados en las unidades de lesionados medulares de los hospitales, para realizar los cuidados diarios y también para tratar las posibles complicaciones que pueden surgir tras una sección completa de la médula espinal en ratas adultas. Algunas de estas complicaciones pueden ir desde pérdidas de peso hasta infecciones en el tracto urinario, hematuria, estreñimiento, úlceras por presión, disestesia, etc. En la sección de material y métodos hacemos una descripción detallada de estos protocolos. Las pautas que seguimos en el cuidado de roedores y monos parapléjicos las hemos publicado en la revista *Journal of Neurotrauma* (Santos-Benito *et al.*, 2006).

**V. Modelos animales de lesión traumática en la médula espinal**

A lo largo del tiempo se han desarrollado varios modelos animales de lesión medular para poder reproducir los diferentes tipos de lesión traumática que tienen lugar en humanos. Para realizar las lesiones por contusión se han desarrollado instrumentos que permiten ocasionar un impacto en la médula espinal expuesta, ejerciendo una fuerza determinada durante un instante de tiempo controlado (Stokes *et al.*, 1992; Gruner, 1992). Los modelos de compresión se suelen llevar a cabo introduciendo en el espacio extradural un balón e hinchándolo por presión (Martin *et al.*, 1992) o utilizando un sistema de compresión mediante clips de aneurisma (Fehlings y Tator, 1995), de manera que la fuerza que se ejerce sobre la

médula espinal persiste a lo largo de un intervalo de tiempo. También se pueden producir lesiones por contusión empleando aparatos diseñados a tal efecto como el New York University (NYU) impactor o el Infinite Horizon impactor. Las lesiones por laceración se suelen realizar mediante incisión quirúrgica, que puede ser de distintos grados e ir desde la sección completa (Ramon-Cueto *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2001), a la hemisección dorsal (Huang *et al.*, 1999; Blesch *et al.*, 2004) o la hemisección lateral (Ballermann y Fouad, 2006).

La mayoría de los estudios se han realizado en ratas adultas, puesto que se trata de animales de fácil manejo y en los que la respuesta histológica del SNC a la lesión es similar a la que ocurre en otros mamíferos superiores como son los humanos. De todos los modelos de lesión anteriormente citados, muchos de los investigadores prefieren la utilización de modelos que conducen a una lesión incompleta de la médula espinal (Li *et al.*, 1998; Imaizumi *et al.*, 2000b; Nash *et al.*, 2002; Ruitenberg *et al.*, 2002; Takami *et al.*, 2002; Verdu *et al.*, 2003), ya que el manejo y cuidado de animales con este tipo de lesión resulta mucho más sencillo que el de animales con sección completa puesto que presentan menores sintomatología y complicaciones. Sin embargo, los resultados obtenidos en diversos estudios con estos tipos de lesión incompleta han demostrado que, a diferencia de lo que ocurre en humanos, en roedores a partir de un 1,4-12% de médula espinal intacta después de la lesión, se puede obtener una recuperación funcional espontánea considerable (Fehlings y Tator, 1995; Steward *et al.*, 2003; Bareyre *et al.*, 2004). De este modo, la interpretación de los resultados en estos estudios resulta bastante complicada, puesto que en la mayoría de los casos se trata de una recuperación funcional espontánea debida a la plasticidad de los axones que permanecieron intactos y no a la regeneración de axones seccionados (Plant *et al.*, 2003; Bareyre *et al.*, 2004). Por lo tanto, para poder distinguir entre regeneración axonal real y plasticidad de axones no lesionados, la lesión de los diferentes haces nerviosos debería ser completa. Todos estos inconvenientes han llevado a muchos autores (incluyendo entre ellos a nuestro grupo) a la utilización de la sección medular completa a nivel torácico como modelo de lesión para sus estudios (Xu *et al.*, 1997; Ramon-Cueto *et al.*, 1998; Ramon-Cueto *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2002; Takami *et al.*, 2002; Fouad *et al.*, 2005).



La dificultad que acarrea el mantenimiento de ratas parapléjicas ha llevado a muchos autores a estudiar su evolución durante cortos periodos de tiempo. Sin embargo algunas terapias requieren más tiempo para promover, de forma efectiva, la regeneración axonal, la reinervación de las dianas, y una recuperación funcional significativa. Por ejemplo, en trabajos previos de nuestro laboratorio, la mayoría de las ratas parapléjicas empezaron a mostrar movimiento voluntario de sus patas traseras, soportando su peso, entre tres y cinco meses después del trasplante de OEG, y algunas lo hicieron tras siete meses (Ramon-Cueto *et al.*, 2000). En cambio, otros grupos que han utilizado el mismo tipo celular, pero periodos de supervivencia más cortos, obtuvieron una recuperación funcional menor tras lesiones medulares completas porque no esperaron el tiempo suficiente para que se pudiera producir el máximo de la mejoría (Lu *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2002; Fouad *et al.*, 2005). Por lo tanto, con el fin de estudiar y optimizar la eficacia de las diferentes estrategias utilizadas para reparar la médula espinal lesionada es conveniente utilizar periodos de supervivencia largos en los animales de estudio (Santos-Benito *et al.*, 2006) y es lo que hemos hecho en el caso de esta tesis. Los protocolos diseñados en nuestro laboratorio para el cuidado de animales con lesión medular completa, adaptados de los utilizados en la clínica humana, nos permiten mantener dichos animales con un buen estado de salud durante periodos de tiempo largos.

## **VI. Estrategias experimentales empleadas para reparar las lesiones de la médula espinal**

Ya en 1928 Ramón y Cajal estableció un dogma revolucionario para la investigación en su campo: los axones lesionados no tienen capacidad de regenerar en el SNC de mamíferos adultos, pero sí que pueden crecer si se les proporciona un entorno favorable (De Felipe y Jones, 1991). De hecho, mediante la utilización de injertos de nervio periférico, lograron estimular el crecimiento axonal en neuronas lesionadas del SNC. Algunos años después, otros investigadores siguieron esta idea pionera con el propósito de encontrar una cura para las lesiones de la médula espinal (David y Aguayo, 1981; Decherchi y Gauthier, 2000; Lee *et al.*, 2004). Desde entonces, se han diseñado nuevas técnicas tratando de proporcionar

a las neuronas las condiciones necesarias para sobrevivir y para regenerar su axón. Estas estrategias se pueden agrupar de la siguiente forma:

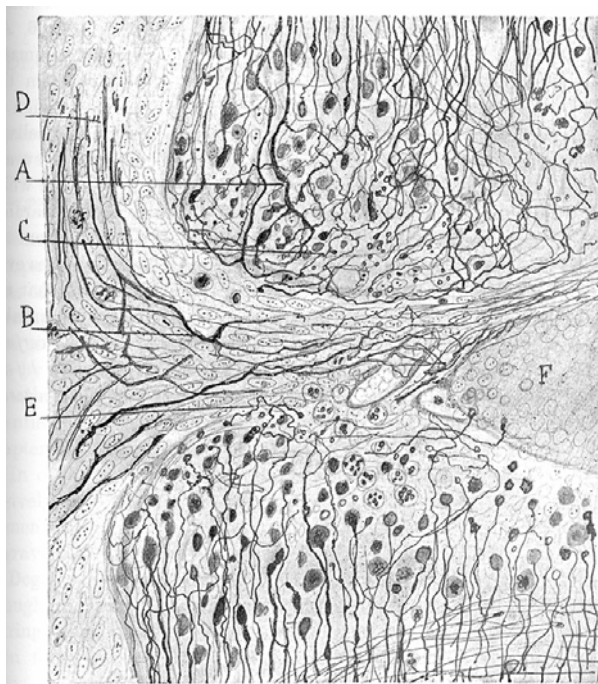


Figura 4. Dibujo original de Ramón y Cajal en el que se muestran los muñones medulares de un perro joven seis días después de una lesión completa. A, C, fibras ramificadas en la porción necrótica de la sustancia blanca; B, fibras de nueva formación llegando desde una raíz anterior regenerada; D, restos de la raíz anterior; E, quiste en proceso de formación; F, quiste (De Felipe y Jones, 1991).

#### VI.1. Fijación de la columna vertebral

La fijación de la columna vertebral es un procedimiento rutinario en la clínica humana (Liu *et al.*, 2003). Cuando se produce una lesión medular severa, uno de los principales problemas, tanto en humanos como en roedores, es el hecho de que la médula espinal se encuentra normalmente sometida a una tensión, y cualquier movimiento de la columna vertebral podría aumentar el tamaño del espacio generado entre los muñones espinales, cambiar la orientación dorso-ventral o causar deformaciones y, consecuentemente producir un daño adicional (Cheng y Olson, 1995; Liu *et al.*, 2003). Además, existe un gran riesgo de introducir

nuevas lesiones por compresión producidas por los tejidos situados por encima de la médula espinal o incluso pellizcos producidos por porciones espinales móviles e inestables (Nieto *et al.*, 2005).

Por otro lado, en los estudios en los que se utiliza modelos animales de lesión severa como la sección completa de la médula espinal, es muy común encontrar una gran variabilidad entre el grado de recuperación motora alcanzada por los diferentes animales de un mismo grupo (Fouad *et al.*, 2005; Lopez-Vales *et al.*, 2005). Esto, según parece, es una consecuencia de la variación individual en la evolución de los cambios patológicos que ocurren en la médula espinal y la cicatriz cuando no se ha estabilizado la columna vertebral, sumado a la efectividad para promover la regeneración de una misma técnica en diferentes animales. Además, una laminectomía de varios segmentos vertebrales suele resultar en una fuerte lordosis que dificulta todavía más la recuperación locomotora (Machida *et al.*, 2005). La postura corporal en estos casos dificulta la correcta posición plantar y el soporte del peso corporal necesarios para dar pasos, incluso en el caso de que el sistema nervioso hubiese recuperado en gran medida el control motor.

A pesar de todo esto y de la utilización habitual en la clínica de instrumentos para fijar la columna vertebral en los lesionados medulares, existen muy pocos grupos que hayan diseñado mecanismos de fijación para sus animales de experimentación (de Medinaceli y Wyatt, 1993; Cheng y Olson, 1995). Una correcta fijación de la columna de forma artificial tras una laminectomía, podría reducir la variabilidad observada entre los individuos de un mismo estudio y podría facilitar la obtención de resultados más reproducibles entre diferentes laboratorios que utilizan la misma estrategia reparadora.

### **VI.2. Administración de factores neuroprotectores y promotores de supervivencia y crecimiento axonal**

Los factores neurotróficos son proteínas reguladoras clave en el sistema nervioso, implicadas en la supervivencia neuronal, el crecimiento axonal, neurotransmisión y plasticidad sináptica. El primero que se descubrió fue el factor de crecimiento nervioso (NGF) (Levi-Montalcini, 1987). Unos cuantos años después se descubrieron varios homólogos del NGF que juntos formaron la familia de las neurotrofinas: el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-

3), NT-4/-5 (Ebendal, 1992; Hefti, 1997). Actualmente se conocen otros muchos factores neurotróficos entre los que se encuentran el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), el factor inhibitorio de leucemia (LIF) o el factor neurotrófico ciliar (CNTF) (revisado en Hefti, 1997; Markus *et al.*, 2002 y Schwab *et al.*, 2006).

Experimentalmente, se ha tratado de aumentar la concentración de estos factores de crecimiento en ratas adultas mediante inyección directa en la zona de la lesión (Schnell *et al.*, 1994), liberación continua en la zona de la lesión mediante minibombas osmóticas (Bradbury *et al.*, 1999), implantación de canales impregnados de factores neurotróficos (Shibayama *et al.*, 1998), o células modificadas genéticamente para producir estos factores. Sin embargo, la supervivencia neuronal o el crecimiento axonal dependen de unas concentraciones óptimas de factores tróficos, mientras que concentraciones puntuales, y demasiado bajas o elevadas resultan ineficaces. Como estrategia alternativa se ha utilizado también la terapia génica. El grupo de Gage y colaboradores (Rosenberg *et al.*, 1988) observó cierto grado de supervivencia neuronal y regeneración axonal cuando trasplantaron fibroblastos modificados genéticamente para secretar el factor de crecimiento nervioso (NGF) en cerebros de ratas que habían sido lesionados. Posteriormente también se ha utilizado esta estrategia en ratas adultas con lesión medular (Tuszynski *et al.*, 1997; Grill *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2002). Sin embargo, aunque en estos trabajos los axones penetraron en los implantes de células secretoras de factores de crecimiento, no fueron capaces de salir de ellos debido a los niveles tan altos y continuos de neurotrofinas en dichos implantes y a las condiciones no permisivas que se encontraban fuera de estos (cicatriz glial o inhibidores de mielina).

La diferencia en la efectividad de las diferentes neurotrofinas se puede explicar en base a variaciones en la densidad de los receptores correspondientes en las neuronas de la médula espinal lesionada (Trk A; NGF; Trk B; BDNF, NT-4/-5; Trk C: NT-3) (Markus *et al.*, 2002; Schwab *et al.*, 2006). En un principio se pensó que el uso de neurotrofinas podría ser una terapia curativa en pacientes con lesión medular (Thoenen y Sendtner, 2002). Actualmente se sabe que esta terapia por sí misma es insuficiente puesto que, aunque son promotores del crecimiento axonal, no son capaces de contrarrestar el efecto inhibitor del entorno. Por lo tanto, experimentos más recientes apuntan a una combinación de la administración de factores

neurotróficos junto con otras estrategias como por ejemplo, la administración de anticuerpos neutralizadores de los inhibidores de mielina (Oudega *et al.*, 2000) o la administración de inhibidores de los proteoglicanos condroitín sulfato (Carulli *et al.*, 2005) para poder aumentar su efecto reparador (revisado en Jones *et al.*, 2001).

Por otro lado, el mayor conocimiento de los procesos patofisiológicos que se producen tras una lesión en la médula espinal ha llevado al estudio de diversos tratamientos farmacológicos neuroprotectores, potencialmente aplicables en clínica. La mayor parte de estos tratamientos van dirigidos a prevenir los procesos celulares y moleculares que tienen lugar en la fase de shock medular para evitar la muerte celular que acontece en estos primeros instantes. En primer lugar se pensó en la utilización de corticoesteroides, ya que gracias a sus propiedades anti-inflamatorias se pensó que reducirían el edema en la médula espinal (Ducker y Zeidman, 1994). Existe una gran cantidad de literatura científica que avala la administración de esteroides en animales experimentales con lesión medular (revisado en Kwon *et al.*, 2004), sin embargo, es importante destacar que los experimentos con animales no han demostrado un efecto beneficioso de manera universal (Faden, 1996). A pesar de esto, la Metilprednisolona por ejemplo, es un corticoesteroide que se aplica en la clínica desde hace 30 años en la etapa aguda de las lesiones medulares. El mecanismo preciso por el cual estos corticoesteroides afectan a la neuroprotección no se conoce, pero se han propuesto como tales la inhibición de la peroxidación lipídica y de las citoquinas inflamatorias, la modulación de las células inflamatorias/inmunes, una mejor perfusión vascular y la prevención del influxo y acumulación de calcio (revisado en Kwon *et al.*, 2004). Mientras que en Estados Unidos esta terapia se aplica habitualmente en clínica, no todos los centros europeos la utilizan puesto que conduce a una mayor tasa de complicaciones (sepsis, sangrado estomacal, pancreatitis, neumonía).

En otros estudios en ratas adultas se han utilizado inhibidores de la ciclooxigenasa que poseen un efecto anti-inflamatorio y disminuyen la formación de radicales libres (ROS) (Schwab *et al.*, 2004). Recientemente se ha descubierto que la eritropoietina (EPO) también puede ser utilizada como una droga glío- y neuro-protectora (Goldman y Nedergaard, 2002).

Además de la Metilprednisolona, el segundo fármaco que ha llegado a la última fase clínica es el Gangliósido Monosialico (GM1), supuesto responsable de

disminuir el daño sobre el tejido del SNC impidiendo la excitotoxicidad inducida por el glutamato (Kwon *et al.*, 2004). No obstante, un estudio reciente pone en duda su aplicabilidad puesto que no ha demostrado de forma concluyente que produzca ningún beneficio en los pacientes tratados (revisado en Hall y Springer, 2004).

### **VI.3. Bloqueo de moléculas inhibidoras del crecimiento axonal presentes en la cicatriz glial y la mielina**

Inhibidores del crecimiento axonal en la cicatriz glial. Como se mencionó anteriormente, la cicatriz glial constituye una barrera tanto física (por la intrincada red tridimensional que forman, fundamentalmente, los astrocitos) como molecular (debido a las moléculas inhibidoras sintetizadas por los componentes de dicha cicatriz) para el crecimiento axonal. Se han diseñado muchas estrategias enfocadas al bloqueo de esta inhibición relacionada con la cicatriz glial. Se considera que los astrocitos reactivos juegan un importante papel en esta inhibición (Fawcett *et al.*, 1989). En estudios pioneros del grupo de Privat (Bochelen *et al.*, 1992; Gimenez y Ribotta *et al.*, 1995) se centraron en la inhibición de la reacción astrocítica que se produce después de una lesión, utilizando derivados del 7- $\beta$ -hidroxicolesterol (Gimenez y Ribotta *et al.*, 1995), como medida para promover la regeneración axonal. La importancia *in vivo*, de los astrocitos reactivos como inhibidores del crecimiento axonal en el SNC quedó también demostrada en un modelo de ratón transgénico en el que la eliminación de dichos astrocitos reactivos promovió la regeneración axonal (Bush *et al.*, 1999).

Por otro lado, los astrocitos reactivos (Bovolenta *et al.*, 1997; Fitch y Silver, 1997), las células inflamatorias y los progenitores de oligodendrocitos que están en la lesión (Jones y Tuszynski, 2002; Jones *et al.*, 2002) expresan proteoglicanos condroitín sulfato (CSPGs), que son potentes inhibidores del crecimiento axonal. Se han llevado a cabo varios estudios en los que se ha intentado eliminar este efecto inhibitorio de los CSPGs mediante deglucosilación utilizando condroitinasa ABC (Bradbury *et al.*, 2002; Morgenstern *et al.*, 2002) y se observó cierto grado de regeneración axonal y de recuperación funcional.

Aunque se ha prestado mucha atención a los CSPGs, existen otros inhibidores del crecimiento axonal que también han sido relacionados con la cicatriz glial o con los componentes de su tejido conectivo extracelular. Entre ellos se encuentran

el colágeno IV (Stichel *et al.*, 1999), la tenascina (Zhang *et al.*, 1997), las semaforinas de clase-3 (Pasterkamp *et al.*, 1998; De Winter *et al.*, 2002) y las Efrinas B3 (Miranda *et al.*, 1999).

*Inhibidores del crecimiento axonal asociados a mielina.* La mielina del SNC tanto intacto como dañado contiene una serie de glucoproteínas inhibitoras del crecimiento axonal (Fournier y Strittmatter, 2001). Estas moléculas son Nogo-A (Caroni *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 2000; GrandPre *et al.*, 2000), MAG (Mukhopadhyay *et al.*, 1994; McKerracher *et al.*, 1994) y OMgp (Wang *et al.*, 2002b) y todas ellas se unen al receptor de Nogo-66, también conocido como NgR1 (Fournier *et al.*, 2001). Se han desarrollado varias terapias tomando como diana estos inhibidores del crecimiento axonal, como por ejemplo el anticuerpo IN-1, que se une a Nogo-A neutralizando su efecto inhibitor (Caroni y Schwab, 1988b). En un estudio pionero de Martin Schwab y Lisa Schnell (Schnell y Schwab, 1990) se trasplantaron células de hibridoma que secretaban IN-1 tras realizar hemisecciones dorsales de la médula espinal a nivel torácico en ratas adultas. Mediante esta técnica observaron regeneración de axones corticoespinales distales a la lesión de hasta 11 mm. Sin embargo, la presencia de más moléculas inhibitoras en la mielina así como de otros inhibidores de la cicatriz glial, sugiere que el bloqueo de la actividad de Nogo podría ser insuficiente para permitir el crecimiento axonal. Además, la utilización de anticuerpos frente a Nogo no parece promover crecimiento axonal de largas distancias en todos los modelos estudiados (Oudega *et al.*, 2000). En otro estudio pionero se utilizó un homogeneizado de médula espinal conteniendo todos los inhibidores de la mielina, para la obtención de anticuerpos contra la multitud de proteínas inhibitoras. Mediante la utilización de estos anticuerpos policlonales reactivos se logró el bloqueo de los inhibidores de crecimiento axonal asociados a mielina (Huang *et al.*, 1999). En este estudio se halló un gran número de axones corticoespinales distalmente a la lesión. Sin embargo, no quedó absolutamente demostrado si el efecto regenerativo observado era debido al bloqueo de los epítopos de superficie mediante los anticuerpos policlonales (Linfocitos B) o a otro posible mecanismo mediado por linfocitos T y por macrófagos, puesto que los macrófagos han demostrado aumentar la permisividad al crecimiento axonal por parte de la sustancia blanca del SNC (David *et al.*, 1990), e incluso estimular el

crecimiento axonal (Rapalino *et al.*, 1998; Schwartz y Yoles, 2006). En otros estudios se ha utilizado un péptido antagonista, diana del receptor de Nogo-A (NgR) con la finalidad de evitar que las neuronas respondan a este inhibidor (Li y Strittmatter, 2003). En este estudio, el tratamiento subcutáneo con este péptido una semana después de la hemisección dorsal torácica promovió el crecimiento de axones CST y de fibras serotoninérgicas junto con cierto grado de recuperación funcional.

#### **VI.4. Administración de factores para potenciar la capacidad regenerativa intrínseca de las neuronas**

Existen varias estrategias enfocadas a estimular la regeneración axonal utilizando como diana moléculas intrínsecas de la propia neurona. Se sabe que la batería de moléculas inhibitoras de crecimiento axonal como Nogo-A, MAG, OMgp, CSPG, Efrina-B3, semaforinas o trombinas conducen a la desestabilización y desensamblaje del citoesqueleto de actina del cono de crecimiento axonal mediante la activación intracelular de Rho-GTPasas (Fournier y Strittmatter, 2001). En general, el citoesqueleto del cono de crecimiento está formado por filamentos de actina, en sus dominios central y periférico, y microtúbulos, que se extienden desde el dominio central a lo largo de toda la longitud del axón (revisado en Suter y Forscher, 2000 y Letourneau, 1996). Los filamentos de actina contribuyen a la formación de unas estructuras llamadas filopodios (los filamentos de actina se disponen formando bandas polarizadas) y lamelipodios (los filamentos se disponen formando una red), encargadas de ejercer la fuerza necesaria para la extensión del cono de crecimiento (revisado en Suter y Forscher, 1998). Datos recientes indican que los miembros de la familia de las Rho-GTPasas son un elemento clave en la regulación de la movilidad o el colapso de los conos de crecimiento (Jalink *et al.*, 1994; Jin y Strittmatter, 1997), en particular RhoA, Rac1 y Cdc42 (Kwon *et al.*, 2002a). Las Rho-GTPasas activadas (unidas a GTP por ejemplo) modulan la actividad de numerosas proteínas, de las cuales la Rho-kinasa o ROCK es la mejor caracterizada. ROCK es la mediadora entre Rho y el citoesqueleto de actina (Amano *et al.*, 2000), por ejemplo mediante fosforilación de la cadena ligera de miosina, contribuyendo al colapso del cono de crecimiento y/o a los efectos de retracción provocados por muchas moléculas inhibitoras del SNC. El bloqueo de la cascada Rho tiene como resultado la regeneración axonal y la recuperación



funcional (Dergham *et al.*, 2002; Fournier *et al.*, 2003) de forma dosis-dependiente (Chan *et al.*, 2005). El AMPc (Adenosina monofosfato cíclica) actúa como señal intracelular para la regulación del crecimiento axonal. Un aumento intracelular de AMPc, activa la protein-kinasa A (PKA), que inactiva a Rho mediante fosforilación y estimula el crecimiento de neuritas *in vivo* tras una lesión medular (Song *et al.*, 1998; Neumann *et al.*, 2002; Qiu *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2004; Nikulina *et al.*, 2004). Una forma de aumentar la concentración de AMPc es la administración de un inhibidor del enzima que lo degrada como es el Rolipram (Nikulina *et al.*, 2004). Sin embargo, puesto que las neurotrofinas, neurotropinas, y los inhibidores de crecimiento axonal comparten a RhoA como sistema de segundo mensajero, la jerarquía para la navegación de los axones en el SNC lesionado todavía necesita ser esclarecida (Schwab *et al.*, 2006).

Otras estrategias del mismo tipo consisten en identificar agonistas asociados con el crecimiento axonal. Por ejemplo, durante el desarrollo del SNC y SNP las neuronas expresan una serie de genes que codifican para las llamadas "proteínas asociadas al crecimiento" o GAPs, entre las que se encuentra GAP-43 o la proteína asociada al citoesqueleto cortical (CAP-43) y otras proteínas asociadas al citoesqueleto. Estas proteínas también se sobreexpresan cuando se produce una lesión en el SNP, promoviendo el crecimiento axonal mediante cascadas de señalización que actúan sobre los filamentos de actina (Woolf, 2001). En un trabajo de Bomze y colaboradores, la sobreexpresión intracelular de estos dos promotores del crecimiento en ratones transgénicos estimuló la mayor elongación axonal *in vivo*, de las neuronas de los ganglios dorsales, colocando también un injerto de nervio periférico en la zona de la lesión para aislar dichos axones del entorno inhibitorio (Bomze *et al.*, 2001). Estos autores proponen que la combinación de dos estrategias (la inducción de la expresión de estas proteínas promotoras del crecimiento y estrategias que modifiquen el entorno no permisivo) podrían promover una mayor regeneración axonal y recuperación funcional en lesiones medulares.

### **VI.5. Trasplantes de tejido y celulares**

Con el fin de facilitar a los axones un sustrato por el que atravesar las cicatrices glial y fibrosa que se forman después de la lesión, se han diseñado diversos tipos de

trasplante en las lesiones medulares de animales experimentales utilizando células, injertos (David y Aguayo, 1981) y puentes realizados con material biológico (Geller y Fawcett, 2002), (revisado en Kwon y Tetzlaff, 2001 y Bunge y Pearse, 2003)). La base para la utilización de estos injertos para reparar lesiones medulares partió de las observaciones de Ramón y Cajal (Ramón y Cajal, 1991), confirmadas posteriormente por otros grupos (David y Aguayo, 1981), en las que demostró que injertos de nervio periférico constituían un entorno favorable para la regeneración tanto de axones del SNP como del SNC. Un problema común a la mayoría de estas estrategias radica en el hecho de que los axones quedan atrapados en el interior de los injertos, sin poder avanzar a través de los muñones medulares (Geller y Fawcett, 2002). Por ejemplo, en un trabajo de Xu y colaboradores, los axones tanto rostrales como caudales que habían sido seccionados, fueron capaces de crecer en el interior de canales poliméricos que contenían células de Schwann y que fueron colocados uniendo ambos muñones medulares, pero fueron incapaces de salir de dichos canales y de invadir el muñón opuesto (Xu *et al.*, 1997).

Finalmente, el trasplante celular es una de las estrategias con mayor aceptación en los últimos años (Reier, 2004). Con el fin de promover la supervivencia celular, la regeneración axonal, remielinizar axones, reemplazar las células perdidas o reestablecer la funcionalidad, tras una lesión medular, se han trasplantado diferentes tipos celulares. Las células de Schwann fueron las primeras que se trasplantaron partiendo de la idea de que estas células formadoras de mielina permiten la regeneración axonal en el SNP y expresan factores de crecimiento promotores de supervivencia y producen moléculas de adhesión celular y componentes de matriz extracelular responsables de crecimiento axonal (Li y Raisman, 1994; Iwashita *et al.*, 2000; Takami *et al.*, 2002; Pearse *et al.*, 2004). Sin embargo, también en este caso, en modelos animales de sección medular completa, los axones en regeneración no fueron capaces de abandonar los trasplantes y reinervar el tejido huésped no permisivo (Moon y Bunge, 2005; Ruitenberg *et al.*, 2006). Otros tipos celulares que han sido objeto de trasplante son por ejemplo los astrocitos (Wang *et al.*, 1995), células inflamatorias (macrófagos y linfocitos) (Rapalino *et al.*, 1998; Bomstein *et al.*, 2003), células modificadas genéticamente para producir factores de crecimiento (células de Schwann, fibroblastos, etc.) (Liu *et al.*, 2002; Blesch *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2004), Tanicitos

(Prieto *et al.*, 2000), células endoteliales (Kitada *et al.*, 2001), células madre (Brustle *et al.*, 1999; McDonald y Howard, 2002; Iwanami *et al.*, 2005) y glía envolvente olfatoria (OEG) (Ramon-Cueto y Nieto-Sampedro, 1994; Li *et al.*, 1998; Ramon-Cueto *et al.*, 1998; Imaizumi *et al.*, 2000b; Ramon-Cueto *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2001; Nash *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2002; Takami *et al.*, 2002; Verdu *et al.*, 2003; Ramer *et al.*, 2004a), entre otras. El trasplante de OEG es una de las estrategias experimentales que más resultados positivos ha producido recientemente (revisado en Santos-Benito y Ramon-Cueto, 2003 y Mackay-Sim, 2005). En nuestro laboratorio obtenemos la OEG a partir del bulbo olfatorio de animales adultos para su utilización en la reparación de la médula espinal lesionada. En los capítulos sucesivos se describirá la estructura de dicho bulbo olfatorio, las propiedades de la OEG y los antecedentes científicos que existen sobre su utilización en este campo.

### **VII. Estructura del bulbo olfatorio (BO)**

El BO es una estructura cilíndrica, situada en la parte más rostral del cerebro, y cuya superficie ventral se encuentra apoyada sobre la lámina cribiforme (o cribosa) del hueso etmoides (Paxinos, 1995). Este órgano constituye la primera estación sináptica de la vía olfatoria. El BO recibe fibras aferentes de dos zonas claramente delimitadas de la cavidad nasal: el epitelio olfatorio y el órgano vomeronasal. La parte del BO que recibe aferencias del epitelio olfatorio constituye el BO principal, y la que recibe aferencias del órgano vomeronasal constituye el BO accesorio. Este último es una estructura con forma de lente, localizada en la parte dorso-caudal y ligeramente medial del BO. Estructuralmente, el BO principal y el accesorio son formaciones muy parecidas con una organización laminar y con los mismos tipos celulares. En lo sucesivo me centraré únicamente en la estructura del BO principal que es la fuente de donde extraemos la OEG.

El BO principal es una estructura organizada en láminas al igual que otras estructuras corticales, y en humanos, su tamaño es relativamente pequeño comparado con el resto del cerebro. Sin embargo, los roedores dependen del sentido del olfato para reproducirse y para sobrevivir, y poseen bulbos olfatorios de un tamaño relativo bastante superior (Paxinos, 1995). Las diferentes capas que lo componen de superficial a profunda son:

### *Capa de los nervios olfatorios (ONL).*

Es la capa más superficial del bulbo olfatorio y está compuesta por los axones de las neuronas olfatorias y por células gliales: OEG, astrocitos y microglía, siendo la OEG la única glía que contacta y envuelve los axones olfatorios (Barber, 1982; Doucette, 1990). Existe una organización topográfica en las proyecciones desde el epitelio al bulbo olfatorio, de manera que las neuronas situadas en una región específica del epitelio olfatorio envían muchas proyecciones a pocos glomérulos y proyectan de forma más difusa a glomérulos adyacentes.

### *Capa glomerular (GL)*

Inmediatamente interna a la capa de los nervios olfatorios se sitúa la capa glomerular. Esta capa es muy fácilmente distinguible porque se compone de los glomérulos, que son estructuras esferoides que constituyen la primera estación sináptica de la vía olfatoria. Es en estas estructuras donde las fibras olfatorias hacen sinapsis con las dendritas de las células mitrales, empenachadas y periglomerulares. Los glomérulos suelen ser ovoides variando su diámetro entre 80 y 160  $\mu\text{m}$ , y las ratas poseen unos 3.000 glomérulos aproximadamente (Paxinos, 1995). Los glomérulos se encuentran rodeados por las células periglomerulares o granulares externas. Se trata de interneuronas que conectan un glomérulo a el/los de al lado. Tienen una dendrita, que se ramifica dentro del glomérulo, y un axón, que se dirige a glomérulos vecinos.

Dentro de los glomérulos olfatorios se establecen dos tipos de sinapsis: axo-dendríticas y dendro-dendríticas. Las sinapsis axo-dendríticas son las que realizan los axones olfatorios con las dendritas de las células mitrales, empenachadas y periglomerulares. Las dendro-dendríticas se producen entre las células mitrales y periglomerulares. Los axones de las células periglomerulares sinaptan con las dendritas de las células mitrales en las proximidades de los glomérulos.

### *Capa plexiforme externa (EPL)*

Está constituida por un plexo dendrítico denso, por las células empenachadas y sus axones y por las células de Van Gehuchten. El plexo dendrítico proviene de las células empenachadas y mitrales, y de la expansión apical de las células granulares internas. Las células empenachadas son neuronas de un tamaño

variable dependiendo de la profundidad a la que se encuentren. Tienen una dendrita apical que sinapta con los axones olfatorios en los glomérulos, una o más dendritas secundarias que se distribuyen por la EPL y un axón. Las células empenachadas se clasifican en externas, medias e internas. Las células empenachadas externas están en la región periglomerular, son las más pequeñas y son interneuronas en su mayoría, aunque algunas de ellas también son neuronas de proyección. Las células empenachadas medias ocupan la mitad externa de la EPL y envían sus axones a la parte más rostral de las áreas olfatorias. Las células empenachadas internas o profundas son las más grandes, están localizadas en la mitad interna de EPL y proyectan fuera del BO a las áreas olfatorias primarias. En la EPL, además, se detectan sinapsis recíprocas dendro-dendríticas entre las dendritas basales de las células mitrales y las dendritas de las células granulares internas. En esta capa sinaptan también las proyecciones centrifugas provenientes de algunas divisiones del núcleo olfatorio anterior con determinadas dendritas distales de las células granulares (Laaris *et al.*, 2007).

Las células de Van Gehuchten se caracterizan por sus dos gruesas dendritas primarias que permanecen en la EPL. Los axones de estas células terminan alrededor de células mitrales y empenachadas (Paxinos, 1995).

### *Capa de las células mitrales (ML)*

Está formada por una hilera de neuronas grandes, triangulares, que tienen una dendrita apical o primaria, otras basales o secundarias y un axón. Aunque se considera que cada célula mitral da origen a una dendrita apical que acaba en un glomérulo, Valverde en 1965 observó que un número pequeño de neuronas tiene dos o tres dendritas para uno o más glomérulos. Estas dendritas atraviesan la EPL, entran dentro de los glomérulos y allí sinaptan con los axones olfatorios. Las dendritas basales, secundarias o accesorias, son de dos a cuatro por cada célula, se orientan perpendicularmente a las apicales y se distribuyen por la EPL. Las dendritas secundarias hacen sinapsis dendro-dendríticas con las células granulares internas. Las células mitrales del BO son las neuronas de proyección por excelencia. Sus axones atraviesan las capas plexiforme interna y granular interna, y se agrupan en haces constituyendo el tracto olfatorio lateral, el cual proyecta a las áreas olfatorias primarias. Durante su trayecto emiten ramas colaterales en la capa

plexiforme interna y la capa granular interna a las dendritas de las células granulares internas (sinapsis axo-dendríticas).

### *Capa plexiforme interna (IPL)*

Es una capa muy delgada, pobre en células, formada por los axones principales de las células mitrales y empenachadas y sus ramas colaterales, y por las dendritas de las células granulares internas.

### *Capa de los granos o granular interna (GrL)*

Está formada por las células granulares o granos, células de axón corto profundas, axones de células mitrales y empenachadas, y axones aferentes al BO. Las células granulares son interneuronas pequeñas y muy numerosas que se agrupan en islotes y que tienen un cuerpo redondeado o fusiforme. Estas células poseen dos expansiones dendríticas: una periférica y de una a cuatro dendritas centrales o basales. La dendrita periférica acaba en EPL y ML, y hace sinapsis recíprocas con las dendritas basales de las células mitrales y empenachadas, además de recibir proyecciones centrifugas de algunas divisiones del núcleo olfatorio anterior. Las dendritas basales divergen en abanico y hacen sinapsis axo-dendríticas con ramas colaterales axonales de las células mitrales y empenachadas (aferencias intrínsecas), y con las proyecciones centrifugas extrínsecas al bulbo olfatorio provenientes de casi todas las estructuras de la corteza olfatoria primaria (aferencias extrínsecas) (Laaris *et al.*, 2007).

Dentro de las células de axón corto se consideran distintos tipos celulares: las células de Blanes, cuyo axón hace sinapsis con los granos más profundos, las de Golgi, cuyo axón se arboriza en los plexos nerviosos de la sustancia blanca, y las de Cajal o de axón descendente, cuyo axón se ramifica en la periferia, en la capa plexiforme externa. Estas interneuronas hacen sinapsis axo-somáticas y axo-dendríticas sobre las células granulares y sobre otras células de axón corto.

### *Capa epitelial o endimaria (EL)*

En esta capa hay células epiteloides redondeadas y fibras provenientes de las células mitrales y empenachadas y de la comisura anterior.

Las neuronas de proyección del BO, es decir, aquellas que llevan la información olfatoria hacia centros superiores, son las células mitrales y las células empenachadas medias y profundas. Las células encargadas de recibir información proveniente de otras áreas cerebrales son, sobretodo, las células granulares internas (Paxinos, 1995).

### **VIII. Glía envolvente olfatoria (OEG)**

Es bien conocido que el epitelio olfatorio es uno de los pocos lugares del cuerpo en el que se produce una continua neurogénesis y crecimiento axonal durante toda la vida de un organismo. Estudios clásicos utilizando marcaje con timidina tritiada y análisis cuantitativos, demostraron que las neuronas olfatorias poseían una vida media corta, permaneciendo en el epitelio olfatorio durante aproximadamente 28 días (Graziadei y Graziadei, 1979). Cuando estas neuronas maduras mueren, son sustituidas por otras nuevas procedentes de la división de las células basales del epitelio olfatorio (Fig. 5). En otros estudios se practicó una axotomía de los nervios olfatorios, lo que produjo la muerte de las neuronas axotomizadas y su reemplazo, y se comprobó que estas tenían una vida media similar (Graziadei y Graziadei, 1979; Graziadei y Monti Graziadei, 1980; Doucette *et al.*, 1983; Samanen y Forbes, 1984). Trabajos posteriores han demostrado que algunas de estas neuronas olfatorias tienen una vida media mucho más larga, llegando a sobrevivir hasta un año (Hinds *et al.*, 1984). Independientemente de la causa de la muerte y reconstrucción celular, los axones de las nuevas neuronas olfatorias tienen que crecer en la dirección correcta, y extenderse a través del epitelio olfatorio (SNP), atravesar la lámina cribosa del hueso etmoides, entrar en el BO (SNC) atravesando la glía limitante y hacer sinapsis con las dendritas de las segundas neuronas de la vía olfatoria y reestablecer la conductividad (Fig. 5). Una diferencia existente entre esta región permisiva al crecimiento axonal y el resto del SNC, es la presencia de unas células que acompañan y envuelven a estos axones en todo su recorrido, la llamada glía envolvente olfatoria (OEG). Estas células han sido propuestas como las promotoras de la capacidad de los axones para regenerar a través de la zona limitrofe entre el SNP y el SNC del bulbo olfatorio (Doucette, 1990) y desde 1994 se sabe que su trasplante en el SNC lesionado permite la regeneración de axones en este entorno no permisivo (Ramon-Cueto y

Nieto-Sampedro, 1994). Debido a estas propiedades, la OEG ha llamado la atención de muchos investigadores por su potencial reparador en determinadas patologías del SNC como son las lesiones en la médula espinal o la esclerosis múltiple (Ramon-Cueto y Nieto-Sampedro, 1994; Ramon-Cueto y Avila, 1998; Franklin y Barnett, 1997; Franklin *et al.*, 2000; Wewetzer *et al.*, 2002).

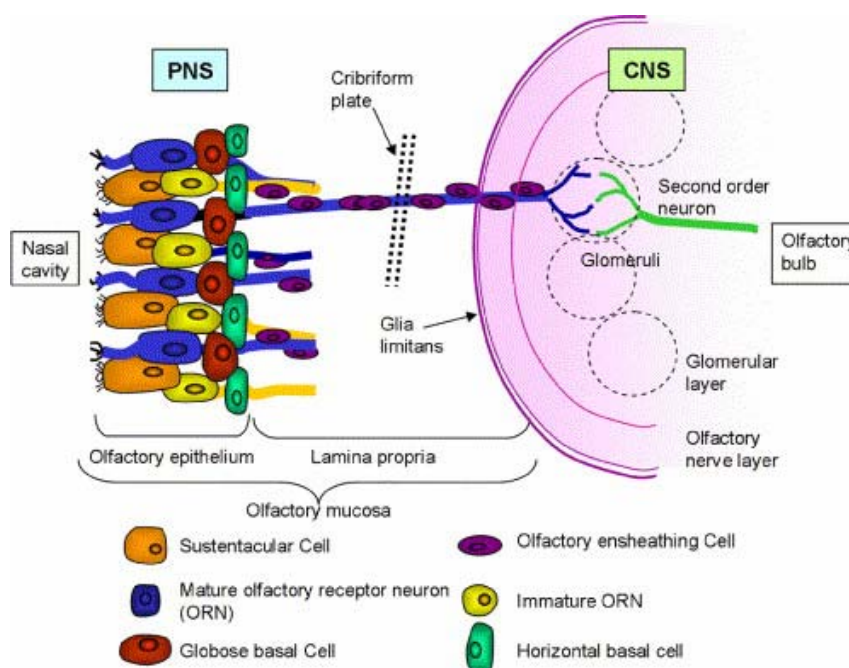


Figura 5. Representación del epitelio olfatorio y el bulbo olfatorio principal (Fairless y Barnett, 2005) .

La OEG fue descrita por primera vez por Golgi (Golgi, 1875) y Blanes (Blanes, 1898). Estas células expresan marcadores gliales típicos que las hacen pertenecer a este linaje celular (Ramon-Cueto y Valverde, 1995). Contienen proteína ácida de los filamentos gliales (GFAP) en sus filamentos intermedios, expresan la proteína S100, son marcadas con el anticuerpo O4 y presentan en su superficie el receptor de baja afinidad del factor de crecimiento nervioso (p75-NGFR) (Barber, 1982; Franceschini y Barnett, 1996; Ramon-Cueto y Nieto-Sampedro, 1992; Ramon-Cueto *et al.*, 1993). El hecho de que la OEG coexista en el SNP y SNC ha creado dificultad a la hora de definirla como glía del SNC o SNP. Sin embargo, estas células se



consideran únicas puesto que poseen características fenotípicas que las diferencian del resto de tipos de células gliales (Ramon-Cueto y Valverde, 1995).

Al igual que los astrocitos y a diferencia de las células de Schwann, la OEG tiene proteína ácida de los filamentos gliales (GFAP) de tipo central (Barber y Lindsay, 1982), forma parte de la glía limitante del BO y carece de lámina basal excepto en aquellas zonas en las que forma parte de la glía limitante (Doucette, 1984; Doucette, 1991), no tiene colágeno entre sus prolongaciones y envía pies perivasculares a los vasos sanguíneos (Raisman, 1985; Doucette, 1990). Al igual que las células de Schwann y a diferencia de los astrocitos, la OEG tiene su origen fuera del SNC (Hinds, 1968; Marin-Padilla y Amieva, 1989; Chuah y Au, 1991; Chuah y West, 2002), tiene vimentina como proteína mayoritaria de sus filamentos intermedios (Liesi, 1985), presenta algunas propiedades inmunocitoquímicas comunes con las células de Schwann como el receptor de baja afinidad del factor de crecimiento nervioso (p75-NGFR), laminina y L1 (Liesi, 1985; Miragall *et al.*, 1988; Valverde y Lopez-Mascaraque, 1991; Pixley, 1992; Franklin *et al.*, 2000; Wewetzer *et al.*, 2002), y envuelve axones (Doucette, 1990; Devon y Doucette, 1992). La glía envolvente tiene un citoplasma electro-denso, más claro que el de las células de Schwann, pero más denso que el de los astrocitos (Mori y Leblond, 1969; Doucette, 1984; Doucette, 1990). Sus filamentos intermedios se encuentran dispersos por el citoplasma y no están agrupados en haces (Doucette, 1990, 1991). La OEG tiene un núcleo lobulado típico que a veces presenta invaginaciones profundas, con una cromatina homogénea aunque ligeramente condensada debajo de la membrana nuclear (Valverde y Lopez-Mascaraque, 1991). La OEG, además, es el único tipo de glía que contacta con los axones olfatorios dentro del BO (Barber y Lindsay, 1982; Doucette, 1984; Raisman, 1985; Valverde y Lopez-Mascaraque, 1991). Por último, la OEG tiene su origen en la placoda olfatoria (Doucette, 1990), mientras que los astrocitos derivan de la vesícula cerebral (Hinds, 1968; Raff *et al.*, 1983), y las células de Schwann lo hacen de la cresta neural (Le Douarin *et al.*, 1991).

Como ya mencioné previamente, a diferencia del resto de regiones del SNC, el BO es un órgano permisivo al crecimiento de axones, y la diferencia radica en sus poblaciones gliales. Además de contener todos los tipos de glía propios del SNC, el BO tiene en sus dos primeras capas la glía envolvente. La OEG parece desempeñar un papel importante en el SNC: promover la elongación axonal en una estructura,

el bulbo olfatorio, donde esto se requiere a lo largo de toda la vida del individuo. Este tipo de glía no sólo tiene propiedades que podrían favorecer el crecimiento de axones, sino que además envuelve a los axones olfatorios en su recorrido dentro del BO evitando que entren en contacto con las células del SNC (Barber, 1982; Doucette, 1984).

#### **VIII.1. Propiedades de la OEG que la convierten en buen instrumento para promover la regeneración axonal en el SNC.**

Aunque todavía no se conoce el mecanismo preciso por el cual estas células promueven la regeneración axonal, existe cierta información importante en la literatura científica que podría explicar en parte esta habilidad reparadora.

En primer lugar, la OEG expresa una serie de **factores neurotróficos** que podrían contribuir a promover la supervivencia neuronal cuando son trasplantadas después de una lesión. Entre ellos se encuentran el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofinas 4/5 (NT4/5), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) y neurturina (NTN) (Wewetzer *et al.*, 2001; Boruch *et al.*, 2001; Woodhall *et al.*, 2001). También la OEG produce el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Kott *et al.*, 1994), neuropéptido Y (Ubinsk y Hokfelt, 2000) y S100 (Franceschini y Barnett, 1996), que son también factores promotores de supervivencia.

Además de sobrevivir, las neuronas también necesitan extender sus axones a través del entorno no permisivo del SNC, y la OEG podría facilitar esta función mediante la expresión de **moléculas de adhesión** o indirectamente **neutralizando los efectos de las señales negativas**. Se ha demostrado que la OEG promueve el crecimiento de neuritas cuando se cultiva con neuronas tanto embrionarias como adultas (Ramon-Cueto *et al.*, 1993; Kafitz y Greer, 1999; Ramon-Cueto *et al.*, 1993; Sonigra *et al.*, 1999). Cuando las neuronas se cultivan con laminina, astrocitos o fibroblastos, las neuritas crecen de forma desordenada mientras que en los co-cultivos con OEG estas crecen orientadas en paralelo. Además la OEG adquiere una morfología alargada, alineada con las fibras en crecimiento y es capaz de envolver neuritas (Ramon-Cueto *et al.*, 1993; Doucette, 1996; Sonigra *et al.*, 1999). La OEG también parece ser un mejor sustrato para el crecimiento axonal que las células de Schwann (Sonigra *et al.*, 1999). Todo esto podría ser debido a la

expresión en superficie de moléculas involucradas en el crecimiento axonal por parte de la OEG como son, L1, laminina, N-CAM, PSA-N-CAM, fibronectina, colágeno tipo IV (Doucette, 1990; Barnett *et al.*, 2000; Franceschini y Barnett, 1996; Kafitz y Greer, 1999; Liesi, 1985; Ramon-Cueto y Nieto-Sampedro, 1992; Reinhard *et al.*, 1988; Fairless y Barnett, 2005) y proteína precursora de amiloide (APP) (Ramon-Cueto y Santos-Benito, 2001). Además, la OEG también expresa una molécula transmembrana de adhesión, neuroligina 3, relacionada con la interacción glía-neurona y glía-glía.

La OEG podría también actuar como “**aislante**”, al envolver las fibras en regeneración y prevenir las de su exposición a moléculas repelentes, del mismo modo que ocurre en el BO. Además, la OEG podría cambiar la respuesta de otras células gliales a la lesión, evitando en parte la liberación de inhibidores en la zona de la lesión. Esto estaría de acuerdo con las observaciones recientes de Franklin y colaboradores (Franklin *et al.*, 2000; Lakatos *et al.*, 2000; Lakatos *et al.*, 2003; Barnett y Riddell, 2004) en las que a diferencia de otros tipos celulares como por ejemplo las células de Schwann, la OEG no induce ningún cambio en los astrocitos hacia su forma reactiva, tanto cuando se co-cultiva con astrocitos (Lakatos *et al.*, 2000) como cuando se trasplanta en la sustancia blanca de médulas espinales de ratas adultas (Lakatos *et al.*, 2003). Tras entrar en contacto con la OEG, no se altera ni el tamaño, ni la forma ni en la expresión de CSPGs por parte de los astrocitos.

Por otra parte, la OEG sobrevive al trasplante y es capaz de **migrar** desde el punto de inyección, cruzar la zona de la lesión y alcanzar regiones distales del muñón caudal o rostral de la ME (Ramon-Cueto *et al.*, 1998; Ramon-Cueto *et al.*, 2000; Boruch *et al.*, 2001). A diferencia de las células de Schwann, la OEG es capaz de entremezclarse con los astrocitos y migrar a su través acompañando a los axones en regeneración (Ramon-Cueto *et al.*, 1993; Ramon-Cueto y Nieto-Sampedro, 1994; Li *et al.*, 1998; Ramon-Cueto *et al.*, 2000; Boruch *et al.*, 2001). Además la OEG es capaz de migrar a través de tejido conjuntivo y nervios periféricos (Ramon-Cueto *et al.*, 1998; Ramon-Cueto *et al.*, 2000). Existen estudios que sugieren que las neuregulinas podrían estar implicadas en la capacidad migratoria de la OEG (Pollock *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 2000; Boruch *et al.*, 2001).

En general, la combinación de todas estas propiedades, junto con otras que todavía se desconocen, parecen ser las responsables de la capacidad única de la OEG para promover la regeneración axonal.

#### **VIII.2. El BO y el epitelio olfatorio como fuente de OEG para terapia regenerativa del SNC.**

Las propiedades de la OEG como células promotoras del crecimiento de axones, las han convertido en candidatas para su trasplante en regiones lesionadas del SNC en las que no existe regeneración axonal espontánea. La OEG se puede obtener tanto a partir de las dos capas más superficiales del BO (Ramon-Cueto y Nieto-Sampedro, 1992; Ramon-Cueto *et al.*, 1993) como del epitelio nasal (Lu *et al.*, 2001; Ramer *et al.*, 2004b). Sin embargo, el BO ofrece algunas ventajas respecto al epitelio como fuente de OEG.

En comparación con el epitelio, el BO es un tejido aséptico, disminuyendo así el riesgo de introducir infecciones en el SNC cuando se realiza un trasplante. Por otro lado, resulta muy difícil eliminar las células de Schwann de los cultivos de epitelio nasal y todavía no se ha descrito ninguna técnica para ello, por lo que, los trasplantes de OEG epitelial contienen una mezcla de los dos tipos celulares (OEG y células de Schwann). Además, las células de Schwann provocan una mayor reactividad por parte de los astrocitos que la OEG, y una mayor expresión de moléculas inhibitoras (Lakatos *et al.*, 2003), no se mezclan adecuadamente con los astrocitos (Lakatos *et al.*, 2000; Lakatos *et al.*, 2003) y presentan mayor dificultad para migrar en el interior del SNC que la OEG (Ramon-Cueto *et al.*, 1998; Ramon-Cueto *et al.*, 2000; Lakatos *et al.*, 2000; Lakatos *et al.*, 2003; Barnett y Riddell, 2004), por lo que un trasplante mixto de OEG con células de Schwann no parece recomendable. Mientras que la OEG del BO se encuentra de forma natural en el SNC, resultándole así más fácil su integración en este tejido, la OEG epitelial se sitúa en un entorno propio del SNP y está en contacto con otros tipos celulares, pudiendo resultar más difícil su integración en el SNC.

En un primer estudio pionero, trasplantes de OEG promovieron la elongación, en la médula espinal de ratas adultas, de axones de las raíces dorsales que habían sido seccionados (Ramon-Cueto y Nieto-Sampedro, 1994). En estudios posteriores, se ha demostrado que otros tipos de axones lesionados también son

capaces de responder positivamente a los trasplantes de OEG, (Ramon-Cueto *et al.*, 1998; Imaizumi *et al.*, 1998; Ramon-Cueto *et al.*, 2000; Imaizumi *et al.*, 2000b; Boruch *et al.*, 2001; Nash *et al.*, 2002; DeLucia *et al.*, 2003). Además de la regeneración axonal, el trasplante de estas células también promovió la recuperación funcional de ratas con lesiones medulares de diferente magnitud (Ramon-Cueto *et al.*, 2000), (revisado en Santos-Benito y Ramon-Cueto, 2003; Li *et al.*, 2003 y Mackay-Sim, 2005)).

El uso de trasplantes de OEG para promover regeneración axonal en el SNC dañado ofrece ciertas ventajas respecto a otras estrategias reparadoras. En primer lugar, la OEG migra con facilidad en un entorno tan poco permisivo como la cicatriz glial y el parénquima, y constituye un “injerto móvil” que extiende el entorno regenerativo más allá de la zona de la lesión. En segundo lugar, se puede obtener OEG a partir de bulbos olfatorios de animales adultos, por lo que un mismo individuo podría ser su propio donante. Esto constituye una gran ventaja puesto que los trasplantes autólogos eliminarían el riesgo de rechazo del tejido, el uso de inmunosupresores durante toda la vida del paciente, la dificultad de encontrar un donante adecuado y los matices éticos debidos a la utilización de tejido fetal o embrionario.

Los resultados obtenidos en los modelos animales experimentales utilizando trasplantes de OEG, así como las ventajas que ofrecen estas células, han llevado a varios expertos a considerar el trasplante de OEG como una de las estrategias más prometedoras en la reparación de la médula espinal lesionada (Pearson, 2003). Sin embargo, como paso previo al traslado a la clínica de una terapia probada con éxito en roedores, esta debería ser probada en animales más cercanos evolutivamente a los humanos, como son otros primates no humanos (Moon y Bunge, 2005). La arquitectura y funcionalidad del sistema nervioso en los roedores no dejan de ser diferentes a las de los primates, por lo que una terapia regeneradora en roedores no tendría necesariamente que actuar de la misma manera en las dos especies. De acuerdo con esto, uno de los objetivos de este estudio es averiguar si la OEG proveniente de BO de primate constituye un recurso accesible para poder ser trasplantada en médulas espinales lesionadas de monos. Esto, a su vez, nos ayudaría a determinar en qué medida, el trasplante autólogo ó heterólogo podría tener futuro en terapia humana.

**VIII.3. Utilización de la glía envolvente olfatoria para reparar lesiones medulares.**

La capacidad de la OEG para estimular la regeneración de axones lesionados en médulas espinales de ratas adultas, ya ha sido probada en un gran número de modelos experimentales diferentes (revisado en Ramon-Cueto, 2000 y Mackay-Sim, 2005). El primer estudio en el que se probó que los trasplantes de OEG promovían la entrada de axones de las raíces dorsales lesionadas en la ME y su elongación a lo largo de varios milímetros en el entorno del SNC (Ramon-Cueto y Nieto-Sampedro, 1994), fue corroborado por los resultados de otros autores (Navarro *et al.*, 1999). Navarro y su grupo, además de reproducir estos resultados, demostraron que esas fibras sensitivas regeneradas recuperaban la actividad refleja, y también se recuperó la función de la vejiga en ratas trasplantadas con OEG (Pascual *et al.*, 2002). En otros estudios trasplantaron cultivos primarios de BO que contenían OEG, macrófagos/microglía, y células endoteliales para reparar lesiones electrolíticas unilaterales del haz corticoespinal (Li *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998). Estos estudios describieron la recuperación de la función motora de las patas delanteras y la regeneración de los axones lesionados a través de la zona de la lesión.

Después de estas primeras evidencias de que la OEG era capaz de promover la regeneración de axones selectivamente seccionados, estas células fueron trasplantadas también en médulas espinales completamente seccionadas. En el primer estudio, se realizó la disección de un segmento medular en ratas adultas y se trasplantó OEG en combinación con células de Schwann (Ramon-Cueto *et al.*, 1998). Se inyectó OEG en cuatro puntos de la línea media de ambos muñones medulares, y se colocó un canal lleno de células de Schwann a modo de puente en el hueco que quedó tras la disección medular. A diferencia de lo que ocurría al colocar sólo el puente con las células de Schwann, la OEG promovió la capacidad de los axones para salir del canal y regenerar cierta distancia. Además algunos axones no entraron en el canal lleno de células de Schwann sino que crecieron a través del tejido conjuntivo con OEG que se encontraba a su alrededor, indicando que para esos axones la OEG sola ofrecía un mejor sustrato que cuando se combinaba con células de Schwann. En otro estudio se probó, también en ratas adultas, la capacidad de la OEG por sí sola para regenerar axones en médulas completamente seccionadas (Ramon-Cueto *et al.*, 2000). En

este trabajo se observó regeneración axonal de larga distancia (3cm) en el muñón medular distal, la OEG migró desde los puntos de inyección en ambos muñones acompañando a los axones en crecimiento, y las ratas parapléjicas fueron capaces de mover sus patas traseras voluntariamente, de colocar los pies correctamente y de soportar su propio peso. Además recuperaron la sensibilidad al tacto leve y propioceptiva.

Después de estos primeros estudios, otros autores han continuado corroborando los resultados obtenidos utilizando modelos experimentales de lesión medular de diferentes grados. Varios grupos han elegido un modelo experimental de hemisección medular en el que se lesionan las columnas dorsales (Imaizumi *et al.*, 2000a; Imaizumi *et al.*, 2000b; Boruch *et al.*, 2001; Nash *et al.*, 2002; Ruitenberg *et al.*, 2002), o la contusión (Takami *et al.*, 2002; Plant *et al.*, 2003) como modelo experimental.

En la mayoría de los estudios realizados hasta el momento en animales de laboratorio con el fin de reparar lesiones medulares en animales, las diferentes terapias regeneradoras se han aplicado inmediatamente después de la lesión (fase aguda). Sin embargo, y puesto que no existe todavía ninguna terapia, la gran mayoría de lesionados medulares se encuentran en la fase crónica de la lesión.

Algunos estudios han sugerido que un pequeño retraso (2 semanas) entre el momento de la lesión y la intervención terapéutica es más favorable para la regeneración axonal y la recuperación funcional (Houle, 1991; Reier *et al.*, 1992; Decherchi y Gauthier, 2000; Coumans *et al.*, 2001; Ferguson *et al.*, 2001; Kwon *et al.*, 2002b). Por otro lado, se ha demostrado que las neuronas son capaces de responder a señales promotoras del crecimiento tras periodos considerablemente largos después de la lesión (Kwon *et al.*, 2002b; Tobias *et al.*, 2003), alentando de este modo el estudio de la aplicación de las diferentes terapias en médulas que llevan tiempo lesionadas.

Al igual que el resto de estrategias reparadoras, en la gran mayoría de estudios en los que se utilizó OEG para reparar médulas espinales lesionadas, los trasplantes se realizaron en la fase aguda de la lesión. A pesar de la necesidad de encontrar una terapia que promueva la regeneración de axones lesionados pasado un tiempo de la lesión, son muy pocos los estudios existentes en la literatura científica en los que los trasplantes de OEG se realicen de esta forma (Lu *et al.*,

2002; Kwon *et al.*, 2002b; Plant *et al.*, 2003; Keyvan-Fouladi *et al.*, 2003; Keyvan-Fouladi *et al.*, 2005; Lopez-Vales *et al.*, 2005; Barakat *et al.*, 2005). Casi todos los estudios existentes utilizaron la lesión incompleta como modelo de lesión, sembrando la duda de que la recuperación funcional observada se deba a una regeneración axonal real o a la ramificación de axones no lesionados (sprouting reactivo) (Kwon *et al.*, 2002b; Keyvan-Fouladi *et al.*, 2003; Plant *et al.*, 2003; Keyvan-Fouladi *et al.*, 2005). Además, en el único trabajo en el que se realizó una lesión completa de la médula espinal, el trasplante de OEG tan sólo se retrasó 1 mes con respecto a la lesión (Lu *et al.*, 2002), lo cual es considerado fase subaguda, y además estos investigadores utilizaron OEG proveniente de epitelio olfatorio (SNP) pero no del bulbo olfatorio. En este estudio Lu y colaboradores observaron que se producía la regeneración de axones de las neuronas del rafe. Sin embargo, este trabajo ha sido objeto de controversias ya que ha sido repetido recientemente por Steward y colaboradores (Steward *et al.*, 2006) sin que ellos observaran ni recuperación funcional ni regeneración axonal cuando trasplantaron lámina propia olfatoria un mes después de la sección completa de la ME. Estos nuevos resultados, además, ponen en duda la capacidad de la OEG proveniente de la lámina propia para promover la regeneración axonal y la recuperación funcional.

Por lo tanto, en la actualidad no existe ningún trabajo científico en el que se haya estudiado la capacidad de la OEG del bulbo olfatorio de reparar médulas espinales completamente lesionadas cuando esta se trasplanta tras 1 mes de la lesión (considerado fase subaguda). Tampoco existe ningún trabajo en el que se haya probado la eficacia reparadora de la OEG (ni del epitelio ni del bulbo olfatorio) más allá de 1 mes de la lesión, es decir, en la fase crónica de la misma. Por todo lo expuesto, y dado que la capacidad regeneradora que la OEG del bulbo olfatorio presenta en la fase aguda de la lesión ha sido demostrada en numerosos trabajos, en esta tesis hemos probado la eficacia de la OEG proveniente de bulbos olfatorios adultos como terapia regeneradora de axones en médulas espinales que se encuentran en las fases subaguda y crónica de la lesión.





## **OBJETIVOS**

El objetivo general en el presente trabajo es abordar en roedores y en primates un mayor acercamiento a la clínica de la utilización de OEG como terapia reparadora de las lesiones medulares, y un mejor conocimiento de aspectos básicos de la utilización de estas células en terapia. Los objetivos específicos son los siguientes:

1. En estudios previos realizados en roedores se llevaron a cabo trasplantes de OEG en la fase aguda de la lesión medular completa, obteniéndose recuperación de la función motora y sensitiva de los animales parapléjicos y regeneración de axones motores y sensitivos en las médulas espinales. A pesar de los resultados positivos, en estos animales no se inmovilizó la columna vertebral en la zona de la lesión, lo que podría favorecer la inestabilidad en la zona y afectar al proceso de cicatrización de la médula y su posterior recuperación, ó incluso favorecer la variabilidad entre los animales de experimentación. Teniendo en cuenta que, además, la fijación de la columna vertebral es una práctica habitual en clínica, se han planteado los siguientes objetivos en esta tesis:
  - 1.1. Desarrollar un sistema de fijación de la columna vertebral en ratas parapléjicas que garantice una mejor aposición y aproximación de sus muñones medulares.
  - 1.2. Analizar si un mejor acercamiento y aposición de los muñones mejora el proceso de recuperación medular.
2. En los estudios previos de nuestro grupo no se disponía de la metodología para analizar y cuantificar en ratas con lesión completa de la médula espinal, el grado de regeneración axonal de cada uno de los haces descendentes que proyectan a la médula espinal. El conocimiento de la capacidad regenerativa que tiene cada uno de los haces permitiría entender la contribución que tiene cada uno a la recuperación funcional de los animales parapléjicos. Para poder hacer un estudio exhaustivo que permita realizar este análisis, otro de nuestros objetivos ha sido el diseño de un método de trazado histológico que permita el estudio de la regeneración de todos los haces lesionados de la médula espinal.

## Objetivos

---

3. En los estudios previos, los trasplantes de OEG se realizaron inmediatamente después de la lesión. En la práctica clínica sería más conveniente poder retrasar la realización de los trasplantes por dos motivos: a) poder disponer del tiempo suficiente para obtener las células del propio paciente y, b) poder estabilizar al paciente antes de una cirugía. Además sería interesante saber si los trasplantes de OEG son también eficaces pasado tiempo de la lesión ya que se abrirían perspectivas en pacientes que llevan tiempo con su lesión medular. Por todo lo expuesto anteriormente, los siguientes objetivos de nuestro trabajo son:
  - 3.1. Determinar si los trasplantes de OEG promueven la recuperación de la función motora de ratas parapléjicas trasplantadas en la fase subaguda y crónica de la lesión.
  - 3.2. Estudiar si la OEG induce la regeneración de axones motores en las médulas espinales de ratas con lesiones medulares subagudas y crónicas.
4. Todos los estudios realizados con OEG se han llevado a cabo en roedores como animal de experimentación. Puesto que el objetivo último es la utilización clínica de estas células, y los BO y la OEG podrían ser diferentes en roedores y en primates, otros de los objetivos de esta tesis han sido los siguientes:
  - 4.1. Evaluar si los BO de primates adultos constituyen una buena fuente de OEG para su uso en terapia.
  - 4.2. Estudiar si la OEG de primate adulto presenta propiedades óptimas para su uso en terapia y si de un BO se pueden obtener en número suficiente para garantizar la realización de trasplantes autólogos.
  - 4.3. Estudiar si los cultivos mantenidos a largo plazo de OEG, tanto de roedor como de primate, constituyen una fuente fiable de OEG para terapia y para otros estudios.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

## **I. CULTIVOS CELULARES**

### **I.1. Cultivos primarios de OEG de rata**

Los cultivos primarios de rata se obtuvieron a partir de los bulbos olfatorios de 44 ratas macho adultas Wistar Hannover (2-2,5 meses de edad) siguiendo el protocolo descrito en un trabajo previo (Ramon-Cueto y Nieto-Sampedro, 1992). Las ratas fueron anestesiadas y decapitadas. Los bulbos olfatorios fueron extraídos y disecados en solución salina equilibrada de Hank (HBSS). Tras quitar la piamadre con mucho cuidado para evitar la presencia de fibroblastos contaminantes en el cultivo, se realizó la disección de las capas del nervio olfatorio y glomerular (ONGL) donde se localiza la OEG. Se lavó el tejido dos veces con HBSS carente de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , y se incubó con Tripsina (tripsina 0,25% peso/volumen; Life Technologies) a 37° C durante 10 minutos. La tripsinización se detuvo añadiendo medio compuesto por una proporción 1:1 de DMEM y Ham's F12 (Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (D/F-10S) y con 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomicina. Se centrifugó el tejido a 200 g durante 5 minutos, se resuspendió en 1 mL de medio D/F-10S y este paso se repitió dos veces más. Tras la última resuspensión en 1 mL del mismo medio de cultivo se logró la disociación de todas las células realizando entre 15 y 20 pases del medio con las células a través de una pipeta Pasteur siliconizada y posteriormente, se realizó el mismo número de pases a través de otra pipeta Pasteur siliconizada cuya punta había sido estrechada. Las células se sembraron en frascos de 25 cm<sup>2</sup> (Falcon) tratados previamente con poli-L-lisina (Sigma; Peso molecular medio, 30.000; 25mg/ml).

Los procedimientos experimentales utilizados siguen las recomendaciones de la Unión Europea para el cuidado y el manejo de animales de laboratorio y fueron aprobados por el comité ético de nuestra institución. Se mantuvo a todas las ratas bajo ciclos de 12 horas de luz/oscuridad y recibieron agua y comida *ad libitum* (excepto las ratas con lesión medular, ver más abajo).

### **I.2. Purificación de OEG de rata que expresa p75**

La OEG-p75 de rata fue purificada, a partir de cultivos primarios confluentes, aproximadamente siete días después de su siembra, siguiendo el protocolo de separación mediante inmunoafinidad con anti-p75 previamente descrito (Ramon-Cueto y Nieto-Sampedro, 1994). Brevemente, las células fueron

despegadas de los frascos con tripsina (tripsina 0,25% peso/volumen; Life Technologies), centrifugadas (200g, 10 minutos), y lavadas con D/F-10S. Este último paso se repitió tres veces y las células fueron entonces resuspendidas en el mismo medio y sembradas en placas petri de 96 mm que habían sido secuencialmente pre-tratadas con un anticuerpo frente a IgG biotinilada de ratón (dilución 1/1000, 12h, 4° C; Jackson Immunoresearch, PA). Tras tres lavados con tampón fosfato salino, pH = 7.3 (PBS), las placas se incubaron con un anticuerpo frente al receptor de baja afinidad del factor de crecimiento nervioso (Hibridoma 192-IgG anti-p75-NGFR, dilución 1/5, 12h, 4° C). Tras lavar las placas con PBS las células fueron sembradas sobre la superficie tratada con el anticuerpo a una densidad de 300.000 células por placa, durante 15 minutos (tiempo aproximado, comprobando que las células se habían pegado), a 37 ° C, 5% de CO<sub>2</sub>. Se realizaron 5 lavados de las placas con DMEM para retirar las células que no se habían pegado. Las células pegadas a las placas petri se despegaron mecánicamente utilizando un raspador de células (Costar) y fueron re-sembradas nuevamente en placas pre-tratadas del mismo modo. Tras repetir los pasos anteriores, las células fueron sembradas en frascos de 25 cm<sup>2</sup> pre-tratados con poli-L-lisina (50mg/ml.). Dos días después de la siembra, el medio de cultivo fue sustituido por D/F-10S suplementado con forskolina 2 µM (Sigma) y extracto bovino de pituitaria (PEX) 20 µg/ml (Biomedical Technologies Inc.). El medio de cultivo se cambió cada dos-tres días.

### **I.3. Cultivos primarios de OEG de mono**

Siete (seis machos y una hembra) monos macacos jóvenes adultos (entre cinco y seis años) fueron sometidos a cirugía bajo anestesia gaseosa para la obtención de 9 bulbos olfatorios. A cinco de los monos (dos *nemestrina* y tres *mulatta*) se les realizó una bulbectomía unilateral y a los dos monos restantes (*mulatta*) se les disecó los dos bulbos olfatorios.

En los monos macacos los bulbos olfatorios se encuentran en una cavidad, situada en la región más rostral de la *fossa cranial anterior*, y cuya pared lateral limita el aspecto medial de la órbita. Ventralmente, los bulbos yacen sobre la superficie de la lámina cribosa del hueso etmoides. La obtención quirúrgica de los bulbos olfatorios de los monos fue llevada a cabo por la Dra. Almudena Ramón Cueto (directora de este trabajo) con la colaboración de la Dra. Carmen Cavada,

en la Universidad Autónoma de Madrid en el marco de otro proyecto de investigación del que la Dra. Ramón era la Investigadora Principal. Todas las disecciones de los bulbos olfatorios, todas las siembras de las células y primeros subcultivos y la congelación de todas las células para su traslado al Instituto de Biomedicina de Valencia fueron realizados por la Dra. Ramón. El estudio *in vitro* que se presenta en esta tesis ha sido realizado en el Instituto de Biomedicina de Valencia.

Se sembró un cultivo por cada bulbo olfatorio ( $n = 9$ ). Se retiró la pía madre para evitar contaminación de fibroblastos en los cultivos, y se disecaron las capas del nervio olfatorio y glomerular (ONLG) donde se localiza la OEG (Fig. 21 A y B). El procedimiento utilizado para la obtención de la suspensión de células a partir del bulbo olfatorio fue el mismo que el utilizado en ratas. Los cultivos de mono presentaron OEG-p75 pura inmediatamente después de su siembra por lo que no fue necesaria una purificación posterior. Las células se sembraron en frascos de 25 cm<sup>2</sup> (Falcon) tratados con poli-L-lisina (Sigma; Peso molecular medio, 30.000; 25mg/ml) y los cultivos se mantuvieron en un incubador (Thermo Forma, modelo 371) a 37° C, 5% CO<sub>2</sub>.

#### **I.4. Sub-cultivos de OEG de mono y de rata**

Una vez que los cultivos primarios de mono y los cultivos de OEG-p75 de rata alcanzaron aproximadamente el 90% de confluencia, las células fueron despegadas con tripsina y sub-cultivadas de la siguiente forma: 80.000 células fueron sembradas en portaobjetos con 8 pocillos pre-tratados con poli-L-lisina (Lab Tek, 10.000 células por pocillo) y se mantuvieron durante 48 h a 37° C en el incubador. El resto de las células fueron sembradas en frascos bajo las mismas condiciones, y tras alcanzar la confluencia de nuevo fueron despegadas y sub-cultivadas. Las células se despegaron de los frascos con Tripsina 0,25% peso/volumen (Life Technologies), y se lavaron tres veces mediante centrifugación con DF-10S. Tras la última centrifugación, las células se contaron y se utilizaron para su caracterización inmunocitoquímica y para el estudio de su vida media. Este procedimiento se repitió durante todo el periodo (16 semanas) de dicho estudio (tercer capítulo de los resultados). Las condiciones de cultivo (sustrato, medio de



cultivo, etc.) para OEG de mono y rata fueron las mismas que las descritas anteriormente para el cultivo primario.

Las células sembradas en portaobjetos fueron procesadas para inmunocitoquímica y para la detección de actividad  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia, y las células sembradas en frascos se utilizaron para calcular las duplicaciones poblacionales (véase más abajo).

### **I.5. Preparación de la OEG para los trasplantes**

Los cultivos de OEG de ratas adultas y la purificación de la OEG-p75 utilizada para los trasplantes se obtuvieron mediante los métodos descritos previamente (I.1 y I.2). Basándonos en los datos de vida media y entrada en senescencia de la OEG (véase resultados) obtenidos en este estudio, los cultivos puros de OEG-p75 se trasplantaron antes de cumplir dos semanas *in vitro* tras la purificación. En ese punto, las células fueron despegadas de los frascos con tripsina (descrito anteriormente), marcadas con bisbenzimidá (10  $\mu$ g/mL Hoechst 33342; Sigma) durante 30 minutos a 37° C y en oscuridad (Ramon-Cueto *et al.*, 1998), lavadas 3 veces con medio DMEM sin suero, resuspendidas en el mismo medio a una densidad de 100.000 células/ $\mu$ L, y trasplantadas en las médulas espinales previamente seccionadas. De cada cultivo de OEG que fue utilizado en los trasplantes, se sembraron unas 50.000 células en Lab Teks para la comprobación, mediante inmunocitoquímica, del porcentaje de células p75 positivas que fueron trasplantadas en cada animal (inmunocitoquímica realizada como se indica en el apartado II.1). Además, al final de cada cirugía de trasplante se calculó, mediante azul de tripán, el porcentaje de células que seguían vivas justo en el momento en el que finalizó la inyección de éstas en la médula espinal, para asegurarnos de que todas las células trasplantadas eran viables.

### **I.6. Cálculo de las duplicaciones poblacionales (DPs)**

Se calculó la tasa de división (DPs) de los cultivos puros de OEG-p75 tras cada tripsinización durante 15 semanas en cultivo. Cada vez que las células alcanzaron el 90% de confluencia, fueron despegadas de los frascos con tripsina, se contaron y se sembraron en frascos de 25 cm<sup>2</sup> tratados con poli-L-lisina, a una densidad de 300.000 células por frasco. Las duplicaciones poblacionales se

calcularon como  $DP = \log (N_f/N_0) / \log 2$ , donde  $N_f$  es el número final de células y  $N_0$  es el número de células que se siembran. También se contó el número de células despegadas de la superficie del frasco (células muertas) para comprobar si su número afectaba al valor de las DPs.

Los cultivos primarios de bulbo olfatorio de mono contienen aproximadamente 90% de OEG-p75 positiva, mientras que los cultivos primarios de rata sólo contienen un 35% (véase resultados). Para poder comparar la capacidad de división de la OEG de rata y de mono, se utilizaron cultivos que mostraban las mismas propiedades inmunocitoquímicas de partida. Por ello, en ratas se purificó la OEG p75-positiva para obtener cultivos con el mismo porcentaje de estas células que el que tienen los cultivos de mono. Además, comparamos los cultivos de OEG de rata y de mono tras el mismo periodo post-siembra. Para ello, en los cultivos de rata el cálculo de las DPs empezó una semana después del inmunopanning (dos semanas *in vitro*) y por tanto el estudio de DPs en OEG de mono empezó también tras dos semanas en cultivo. A partir de este punto, se despegaron las células para empezar con el estudio de su tasa de división y este fue considerado el punto "cero".

### **I.7. Estudio del efecto de los agentes mitógenos**

El medio de cultivo óptimo utilizado habitualmente para la OEG contiene forskolina 2  $\mu$ M (Sigma) y extracto de pituitaria bovino 20  $\mu$ g/mL (Biomedical Technologies Inc.). Para analizar el efecto de estos agentes mitógenos sobre la vida media y la tasa de división de la OEG, un cultivo de roedor y dos cultivos de OEG de mono fueron divididos y los cultivos "hermanos" se mantuvieron en paralelo bajo las dos condiciones, con y sin mitógenos, y se realizó el mismo estudio que con el resto de cultivos (estudio fenotípico y cálculo de sus tasas de división).

### **I.8. Estudio del efecto de la congelación-descongelación**

Para estudiar el efecto de la congelación-descongelación sobre la viabilidad de la OEG de rata y de mono, congelamos cultivos puros de OEG una ( $n = 4$ ) o dos ( $n = 2$ ) semanas tras su purificación. Estas células fueron descongeladas y puestas en cultivo de nuevo, y se estudió en paralelo la evolución de cada cultivo tras la descongelación, comparándola con la de ese mismo cultivo no congelado.

### **I.9. Estudio del efecto de la concentración de oxígeno**

Seis cultivos de OEG de rata y uno de mono fueron divididos en dos. Una mitad (6+1) se mantuvo bajo las condiciones habituales antes descritas y la otra mitad se mantuvo, en paralelo, bajo condiciones de baja concentración de oxígeno utilizando un incubador Heraeus (modelo 6060, Hanau, Alemania) a 37° C, 3% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. En estos cultivos se realizó el mismo seguimiento que en el resto.

## **II. TINCIONES DE LOS CULTIVOS CELULARES**

### **II.1. Inmunocitoquímica**

Tanto en el estudio de los cambios inmunocitoquímicos a lo largo del tiempo en cultivo, como para cuantificar el porcentaje de células p-75 positivas que se utilizó en cada trasplante, el proceso de tinción inmunocitoquímica utilizado fue el mismo. Dos días tras sembrar las células en Lab Tecks, éstas fueron fijadas con paraformaldehído 4% recién preparado (10 minutos, temperatura ambiente) y se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios: anti-proteína ácida de los filamentos gliales (anti-GFAP; BD Biosciences) (dilución 1:100), anti-S100 (Dako) (1:100), y anticuerpos frente al receptor del factor de crecimiento nervioso p-75 (p-75 NGFR) de rata y de humano (obtenidos respectivamente a partir del sobrenadante de los hibridomas 192 y 8837), dilución 1/2, y anti-O<sub>4</sub> (del Developmental Hybridoma Bank, Iowa City, IA), dilución 1/10. Los primeros subcultivos obtenidos a partir de BO de mono fueron incubados también con un anticuerpo monoclonal frente a L1 (1:400), otro frente a colágeno tipo IV (1:500; clone COL-94, Sigma) y anticuerpo anti-NG2 Proteoglicano condroitín sulfato (1:500; Chemicon).

Las incubaciones con anticuerpos primarios frente a GFAP, S100, O<sub>4</sub>, laminina, L1, NG2 y colágeno tipo IV se llevaron a cabo durante la noche a 4° C. La incubación con p75 se realizó *in vivo*, antes de la fijación, durante 45 minutos en el incubador a 37° C. Como anticuerpos secundarios utilizamos anti-IgGs conjugados con Oregon Green, Texas Red (Jackson ImmunoResearch) y Alexa Fluor (Molecular Probes) a una dilución 1:200. Las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente en oscuridad durante una hora. Las preparaciones se cubrieron con Fluoromount (Valteknova) y un cubreobjetos.

## II.2. Co-tinción de la actividad $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia ( $\beta$ -Gal-AS) y p75

Para la realización de la doble tinción de p-75-NGFR y actividad  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia se incubaron las células con el anticuerpo frente a p-75-NGFR descrito en el apartado anterior y se fijaron con glutaraldehído 0,5% (10 min., temperatura ambiente). Tras lavar con tampón fosfato salino (PBS) incubamos las células en solución de tinción para detectar la actividad  $\beta$ -Gal-AS, a 37° C durante toda la noche (Dimri *et al.*, 1995). Esta solución se compone de una mezcla de tampón cítrico-fosfato (200  $\mu$ L/mL), ferrocianuro y ferricianuro potásicos 100 mM (50  $\mu$ L/mL), NaCl 5M (30  $\mu$ L/mL), MgCl 1M (2  $\mu$ L/mL), solución X-gal 40 mg/mL (25  $\mu$ L/mL) y agua 643  $\mu$ L/mL. Esta solución se preparó fresca cada vez y se utilizó para incubar las células durante 12-16 horas en oscuridad a 37° C. Tras los lavados, incubamos las células con un anticuerpo anti-IgG biotinilado (dilución 1:200, Jackson ImmunoResearch, PA) durante una hora a temperatura ambiente, las lavamos de nuevo, y las incubamos con estreptavidina-peroxidasa (1:100, Sigma) durante una hora a temperatura ambiente. Para el revelado utilizamos una solución de 3, 3'-diaminobenzidina (0,5mg/ml; Sigma) y peróxido de hidrógeno 0,03% en tampón Tris-HCl 0,05 M, pH 7,6. Se realizaron contajes de las células teñidas con ambos marcadores y se tomaron fotografías con un microscopio invertido Zeiss.

## III. CIRUGÍAS

### III.1. Grupos experimentales

Para la realización de este estudio se utilizaron veintidós ratas hembras adultas Wistar Hannover (2,5 - 3 meses de edad, 200-300 g). Estos animales se agruparon en cuatro grupos: Cinco de estos animales recibieron el trasplante de OEG un mes después de la lesión (fase subaguda, **grupo SA**). Otros cinco animales fueron trasplantados 4 meses tras la lesión (fase crónica, **grupo Cr**). Seis animales formaron el grupo de animales control no trasplantados (grupo **No-T**), a los que se les inyectó medio de cultivo DMEM sin células en los mismos puntos de la médula espinal; a tres de ellos 1 mes y a los otros tres 4 meses después de la lesión. Otros 6 animales fueron sometidos al mismo procedimiento quirúrgico pero sin seccionar sus médulas espinales (**grupo Sham**), y este se utilizó como grupo de animales control (no lesionados) para los estudios histológicos y de recuperación funcional. Además

estos animales fueron re-abiertos al mismo tiempo que los trasplantados y los no trasplantados, 1 mes (tres de ellos) y 4 meses (los otros tres) tras la laminectomía.

### **III.2. Primera cirugía: cirugía de lesión**

Las 22 ratas fueron anestesiadas con una mezcla de isoflurano y O<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>O (40:60). Para prevenir infecciones, se les inyectó intraperitonealmente un antibiótico, Augmentine (amoxicilina/ác. clavulánico, 1g/200mg, GlaxoSmithKline) al principio y al final de la cirugía. Además se utilizó una solución oftálmica para evitar el secado de los ojos. Durante la cirugía y para evitar la hipovolemia se inyectó subcutáneamente 0,5-1 mL de Ringer lactato.

En todas ellas se practicó una laminectomía para exponer los segmentos medulares torácicos 8 y 9 (T8-T9). Para ello se realizó la laminectomía de las vértebras T7, T8 y T9. Se cortó la duramadre longitudinalmente y, también, lateralmente en los bordes proximal y distal de la laminectomía (en forma de H). En 16 de estos animales se administró lidocaína sobre la médula expuesta y se procedió a la sección de la médula espinal con micro-tijeras de iridectomía, levantando posteriormente ambos muñones para asegurarnos de que la sección había sido completa (Ramon-Cueto *et al.*, 2000) (Fig. 6A). Estos animales fueron sometidos a una segunda cirugía para estudiar la efectividad de los trasplantes de OEG en los dos puntos temporales seleccionados (1 y 4 meses post-lesión).

En todos los animales, al final de la primera cirugía (cirugía de lesión) la médula espinal expuesta fue cubierta con durafilm (Ferrosan) y, para estabilizar la columna vertebral se colocaron unos puentes de resina cubriendo el hueco creado por la laminectomía (véase más abajo).

Se suturaron los músculos y la piel y la herida fue lavada con una solución antiséptica. Los animales se mantuvieron sobre una manta eléctrica regulada termostáticamente hasta que estuvieron completamente despiertos.

### **III.3. Segunda cirugía: trasplante de OEG**

En la segunda cirugía los animales fueron anestesiados de nuevo para ser re-abiertos 1 ó 4 meses después de la lesión. Se retiró los puentes de cemento. Con el fin de visualizar la zona de la lesión, se disecó cuidadosamente la gruesa capa de tejido conjuntivo que se había formado debajo de los puentes y encima de la

médula espinal (Fig. 6D). Es muy importante identificar el sitio preciso de la lesión y el lugar exacto en que empiezan tanto el muñón caudal como el muñón rostral para poder inyectar las células a la distancia correcta de su borde.

Una vez expuestos los muñones medulares (Fig. 6E), en los grupos SA (n = 5) y Cr (n = 5) se inyectó de forma estereotóxica la OEG que había sido preparada y marcada con Hoechst según se explicó anteriormente. Las inyecciones se llevaron a cabo en 4 puntos en la línea media de ambos muñones, a 1 mm de distancia del límite del muñón (Ramon-Cueto *et al.*, 1998). En este caso, puesto que tras la lesión medular se produce una degeneración de las regiones medulares cercanas, y por lo tanto se produce un adelgazamiento de la médula, no se pueden utilizar las mismas coordenadas de estudios previos para inyectar las células, ya que el grosor de la médula espinal ya no es equivalente al que se observa inmediatamente después de la lesión. Además también el proceso de degeneración y retracción de los muñones puede no ser idéntico entre animales, y no tener todos los animales el mismo grosor en los muñones a la distancia a la que se inyectan las células (1 mm). Como por este motivo, no se pueden usar las coordenadas que se utilizaron en estudios previos (Ramon-Cueto *et al.*, 1998; Ramon-Cueto *et al.*, 2000), y para poder inyectar en regiones equivalentes, procedimos a ajustar intraoperatoriamente las coordenadas en cada uno de los animales para adaptarlas a las características de los muñones medulares en la fase subaguda y crónica (1 y 4 meses post-trasplante). Los muñones medulares en la fase subaguda y crónica se mostraron más aplanados que en las médulas espinales inmediatamente lesionadas y pudimos comprobar que el adelgazamiento medular era similar en todos los animales, presentando una distancia dorso-ventral de aproximadamente 2 mm. Por este motivo, y para inyectar las células en lugares equivalentes a los estudios previos, las coordenadas (expresadas en milímetros) de los 4 puntos de inyección fueron de ventral a dorsal 1,3, 1,0, 0,8 y 0,5 respectivamente. En cada punto se inyectó 0,5 µl de suspensión celular que contenía 50.000 células (un total de 200.000 células por muñón). Tras cada inyección se esperó 3 minutos antes de subir al punto siguiente, para permitir el asentamiento de las células, y tras la inyección más dorsal este tiempo fue de 5 minutos antes de sacar la aguja cuidadosamente, para evitar el rebosamiento de las células. Para las inyecciones se utilizaron agujas de vidrio estériles (Fig. 6F) (80 µm de diámetro interno, 100 µm de diámetro externo)

conectadas a una jeringuilla Hamilton mediante un sistema de tubos sellado y lleno de aceite estéril. A los animales control No-T (n = 6) se les inyectó 0,5 µl de DMEM en cada punto, en las mismas coordenadas y a los mismos tiempos post-lesión. Los animales Sham (n = 6) también fueron re-abiertos a los mismos tiempos pero no se les inyectó nada.

En todos los animales se colocó de nuevo un puente de cemento dental cubriendo el agujero de la laminectomía.

Se dejó sobrevivir a todos los animales durante 12 meses después de la primera cirugía (cirugía de lesión).

#### **III.4. Tercera cirugía: Inyección del trazador neuroanatómico**

Doce meses después de la cirugía de lesión, los animales fueron sometidos a una tercera cirugía para la inyección del trazador. Las ratas fueron anestesiadas de nuevo y los muñones fueron nuevamente expuestos. Para ello fue necesario retirar cuidadosamente los puentes de cemento, y el tejido conjuntivo nuevamente formado debajo de ellos para poder inyectar el trazador de forma adecuada.

Con el fin de trazar todos los haces ascendentes y descendentes de la médula para poder determinar la contribución de cada haz a la recuperación sensorimotora observada, se inyectó estereotáxicamente un cóctel de 25% Peroxidasa de rabanillo (Horseradish peroxidase-HRP) y 5% aglutinina de germen de trigo (WGA)-HRP preparado en NaCl 0,9% estéril. La peroxidasa (HRP) es una enzima que depositada en el espacio extracelular es captada por las neuronas tanto a nivel de los axones como del soma y dendritas, por pinocitosis. Sin embargo, su capacidad de difusión es mayor de lo deseable para conseguir inyecciones restringidas, por lo que se conjuga con la lectina WGA ya que ésta se une a los terminales sacáridos de ácido siálico de las membranas celulares, permitiendo que la difusión del trazador sea mucho menor que la de la HRP sola. Además, la WGA aumenta en un 500% la afinidad de las membranas neuronales por la HRP lo que resulta en un marcaje mucho más intenso tanto de los terminales axónicos como de los somas neuronales (Mesulam, 1982). Una vez en el interior de la célula, la WGA-HRP queda envuelta por membrana, formando vesículas, y pudiendo ser transportada de esta manera a lo largo de toda la célula y de su axón, tanto anterógrada como retrógradamente. El transporte retrógrado del trazador es aquel que se dirige desde los

terminales axónicos localizados en la zona de inyección hasta el soma neuronal, mientras que el anterógrado lleva el trazador captado en el soma y las dendritas hacia los terminales axónicos. En nuestro estudio, el transporte retrógrado del trazador y su acumulación en los somas neuronales supraespinales nos permitió la identificación de las neuronas que regeneraron su axón hasta el punto de inyección del trazador, pudiendo identificar así las neuronas de los distintos núcleos del tronco del encéfalo y de la corteza motora que se han marcado retrógradamente.

Una vez expuestos los muñones, se inyectó el trazador en trece puntos del muñón caudal (0,1 µl /punto) de la médula espinal a nivel T9 (a 0,5 cm de distancia del borde del muñón caudal). Las coordenadas utilizadas fueron de ventral a dorsal 2, 1,6, 1,2, 0,8, 0,4 mm en la línea media, y luego se desplazó la aguja lateralmente desde la línea media 0,8 mm a ambos lados y las coordenadas de inyección en los puntos laterales fueron 1,6, 1,2, 0,8, 0,4 mm. Las inyecciones se realizaron con agujas de vidrio estériles (50 µm de diámetro) conectadas a una jeringa Hamilton del mismo modo que en los trasplantes, y de ventral a dorsal. Tras cada inyección esperamos 1 minuto y el tiempo de espera después de la inyección más dorsal fue de 5 minutos, para evitar el rebosamiento del trazador. Mediante este método, todos aquellos axones capaces de regenerar a través de la cicatriz y de penetrar en el muñón caudal, pudieron captar el trazador y transportarlo retrógradamente a los somas neuronales supraespinales donde se acumuló. Se dejó sobrevivir a los animales durante 48 horas antes de ser perfundidos.

#### **IV. FIJACIÓN DE LA COLUMNA VERTEBRAL**

##### **IV.1. Fabricación de los puentes de cemento**

Los puentes utilizados para fijar la columna vertebral se fabricaron utilizando cemento dental (DuraLay; Keliance, Dental MFG. Co.; Illinois; U.S.A.), una resina acrílica autopolimerizante, comúnmente utilizada en la clínica dental y que ha demostrado tener una excelente compatibilidad con el tejido (Cahi *et al.*, 1996; McDonnell *et al.*, 2004). Estos puentes se fabricaron mezclando el polvo y el líquido Duralay según las instrucciones del fabricante. Cuando la consistencia de la mezcla fue similar a la de una goma, cortamos una pieza rectangular de 14 x 15 mm aproximadamente y utilizamos un molde cilíndrico de 3 mm de diámetro para darle



la forma de puente. Entonces esperamos unos minutos hasta que la consistencia fue completamente dura y los puentes fueron esterilizados bajo luz ultravioleta antes de ser utilizados.

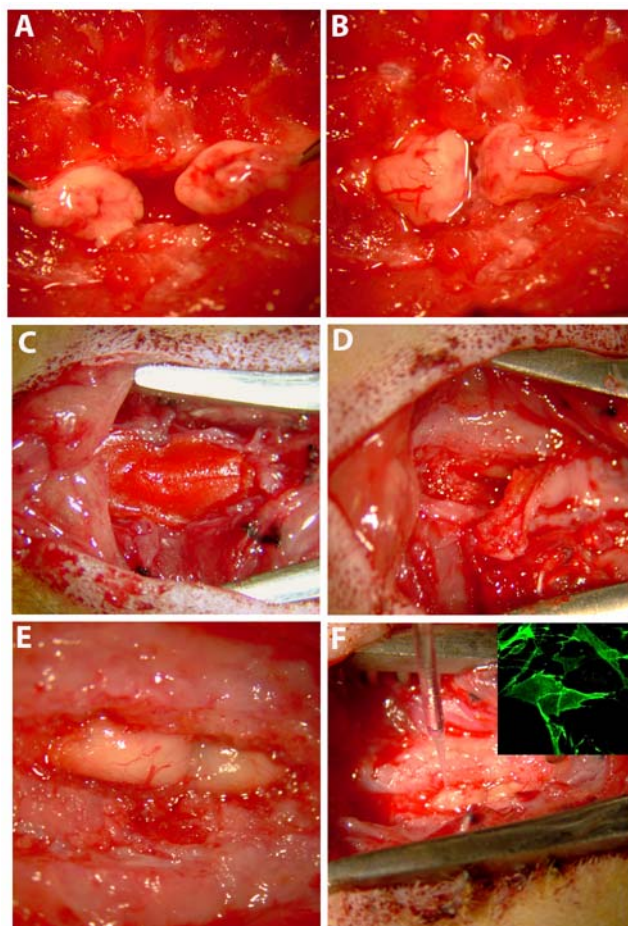


Figura 6. Aspecto *in vivo* del área quirúrgica en los diferentes pasos durante las cirugías. A. Sección completa de la médula espinal mostrando los dos muñones levantados. B. Muñones de la médula seccionada colocados de nuevo en el canal vertebral. C-F. Aspecto de la zona de la lesión durante la segunda cirugía. C. Puente de resina firmemente adherido a los procesos espinosos y las láminas de las vértebras adyacentes intactas. D. Capa densa de tejido conjuntivo cubriendo los muñones medulares y firmemente adherida a las estructuras circundantes. E. Aspecto de los muñones medulares tras disecar el tejido conjuntivo 4 meses después de la sección completa. F. Área de la lesión durante la inyección de las células con una aguja de vidrio. Detalle de la OEG pura utilizada para los trasplantes, marcada con un anticuerpo frente a p75-NGFR.

Para poder fijar los bordes del puente a los procesos espinosos y las láminas de las vértebras adyacentes intactas (T6, T10), se preparó mezcla fresca en el quirófano.

### **IV.2. Estudio de la inocuidad del cemento dental sobre médulas espinales no lesionadas**

Se utilizó un grupo de 9 ratas adultas Wistar Hannover (2,5 - 3 meses de edad, 200-300g) para evaluar la presencia de posibles signos de reacción inflamatoria ocasionados por la colocación de los puentes de cemento sobre sus médulas espinales, así como la resistencia de la unión de dichos puentes de cemento a las vértebras adyacentes intactas.

Estos animales sufrieron una laminectomía igual que la que se explicó anteriormente para los animales sham, sin sufrir ninguna lesión en su médula espinal. Se realizó la misma sección en la duramadre en forma de H y se colocó un puente de cemento cubriendo el agujero creado por la laminectomía tal y como se ha explicado. Se les dejó sobrevivir durante un periodo de dos semanas, al final del cual fueron perfundidos y sus médulas espinales fueron procesadas, tal y como se explica más abajo en el apartado de histología, con el fin de detectar cualquier signo de respuesta inflamatoria. Estos animales se utilizaron también para determinar la dificultad del acceso a la médula espinal una vez retirados los puentes de cemento.

## **V. CUIDADOS POST-OPERATORIOS**

### **V.1. Cuidados diarios y tratamiento de complicaciones**

Todas las ratas recibieron cuidados post-operatorios, incluyendo la inyección subcutánea de 1 mL de solución Ringer lactato y la inyección intramuscular de metamizol magnesio como analgésico (Nolotil, Boeringer Ingelheim) (80 µl de una dilución 1:5 en NaCl 0.9% estéril) en la pata delantera al final de la cirugía. En ese mismo momento se administró intraperitonealmente un antibiótico, Augmentine (amoxicilina/clavulánico ácido, 1g/200mg, GlaxoSmithKline) a una dosis de 2 mg /100 g de peso corporal, y se volvió a administrar dos veces

más cada 8 horas tras la cirugía. Se preparó una dosis nueva de antibiótico cada vez, puesto que el preparado es inestable tras una hora.

El vaciado manual mediante presión de la vejiga de los animales parapléjicos se realizó 4 veces al día hasta que se desarrolló el reflejo de vaciado autónomo. Entonces el vaciado de las vejigas se fue reduciendo paulatinamente hasta llegar a ser de una vez diaria hasta el final del experimento (Santos-Benito *et al.*, 2006).

Tras la cirugía, los animales dispusieron de comida y bebida *ad libitum*. Cuando el peso corporal se estabilizó entre 270 y 280 g, la cantidad de comida se ajustó individualmente para mantener a todos los animales en el mismo rango de peso (270-280g). Esto es importante para poder comparar la recuperación funcional alcanzada por los diferentes animales. La dieta normal es de unos 20g de comida seca, que se aumentó o se disminuyó en intervalos de 1 g individualmente, dependiendo del peso de la rata, pero nunca por debajo de 16 g. La comida se administró una vez al día inmediatamente después de la realización de los tests de comportamiento.

Las ratas parapléjicas fueron sometidas a una exploración diaria (tabla 1) con el fin de poder detectar y tratar inmediatamente las posibles complicaciones (tabla 2).

---

**Tabla 1** **CUIDADO DIARIO DE RATAS PARAPLÉJICAS**

Administración de comida	Una vez al día
Vaciado de vejiga urinaria	Cuatro veces al día <sup>1</sup>
	Una vez al día <sup>2</sup>
Control de la orina	Durante el vaciado de vejiga
Control de ingesta de agua	Una vez al día
Masaje abdominal	Una vez al día
Recogida de heces	Una vez al día
Exploración de piel, mucosa, músculos, huesos, articulaciones	Una vez al día
Exploración de sensibilidad y reflejos	Una vez a la semana
Medida del peso corporal	Una vez a la semana <sup>3</sup>

---

<sup>1</sup>A corto plazo tras la lesión    <sup>2</sup>Reduciendo progresivamente desde 4 veces al día.

<sup>3</sup>Inmediatamente después de la lesión todos los días.

**Tabla 2** SÍNTOMAS APARECIDOS EN ALGUNAS RATAS Y SUS TRATAMIENTOS

<u>Complicación(% ratas que la presentaron)</u>	<u>Dosis</u>
<u>Tratamiento</u>	
<b>Pérdida de peso (75%)*</b>	
Complejo con proteínas, vitaminas y minerales	50mg/100g. Hasta 4x/día, a.o.
NaCl 0.9% o Ringer Lactato (deshidratación)	Volumen según gravedad, s.c., i.v.
<b>Infecciones del tracto urinario (45%)</b>	
Amoxicilina más ácido clavulánico (1ª opción)	5.8 mg/100g. 2x/día, a.o.
	2 mg/100g. 2x/día, i.p.
Norfloxacina (2ª opción)	7 mg/rata 2x/día, a.o.
<b>Hematuria (13%)</b>	
Lactato ferroso	20 ml/100g. hasta 3x/día, a.o.
<b>Úlceras por presión (13%)</b>	
Lavado; cicatrizante y desinfectante (en caso de necesidad)	1x/día, a.t.
<b>Disestesias (13%)</b>	
Igual que úlceras + vendaje + repelente	1x/día

Las dosis están expresadas por unidad de peso corporal, y por rata. Expresiones como **3x/día** indican el número de administraciones por día. **a.o.**: administración oral; **i.m.**: intramuscular; **i.v.**: intravenosa; **i.p.**: intraperitoneal; **s.c.**: subcutáneo; **a.t.**: administración tópica. \*La pérdida de peso sólo se produjo durante el primer mes después de la cirugía de lesión.

## **V.2. Fisioterapia y rehabilitación**

Con el fin de retrasar la aparición de atrofia muscular, evitar deformaciones, mantener las articulaciones en buena forma, y prevenir contracturas en las mismas, realizamos masajes circulares suaves y lentos en todos los músculos situados por debajo del nivel de la lesión en todas las ratas parapléjicas (trasplantadas y no trasplantadas) todos los días. Además, los masajes ayudan a mantener la circulación sanguínea tanto en los músculos como en la piel, evitando así posibles atrofias. También realizamos movimientos diarios de flexión y extensión de los dedos, tobillos, rodillas y caderas, adducción y abducción de la cadera y movimientos circulares de la cadera y tobillo en las dos direcciones (veinticinco veces en cada articulación). Además de esto, se dejó a las ratas moverse libremente en un campo abierto (45 x 80 cm) con una pequeña rampa en su interior, cada día durante 20 minutos.

Los tests de comportamiento de la rampa inclinada y en campo abierto utilizados en el análisis de la recuperación funcional (ver más abajo) se realizaron semanalmente y también contribuyeron a la rehabilitación.

## **VI. ESTUDIO DE LA RECUPERACIÓN FUNCIONAL**

### **VI.1. Test de la rampa inclinada**

Todos los animales (n = 22) fueron entrenados para desarrollar el test de la rampa inclinada, y este entrenamiento se llevó a cabo desde que los animales cumplieron un mes de edad hasta la primera cirugía (Ramon-Cueto *et al.*, 2000). En concreto, para superar el test, las ratas tienen que pasar completamente sus cuerpos a una plataforma horizontal plana tras trepar por una rejilla de agujeros cuadrados de 25 x 25 mm. El test cuenta con 4 niveles de dificultad (1-4) dependiendo del ángulo de inclinación de la rejilla (45°, 60°, 75°, ó 90° respectivamente). Para motivar a los animales se les acostumbró, desde que cumplieron un mes de edad, a comer crema de chocolate, y este fue el premio que se les dio tras superar cada nivel. Con el fin de evitar la desmotivación de los animales que no fueron capaces de superar un determinado nivel, se fabricó una pequeña rejilla horizontal, con la que se facilitó el acceso a la plataforma horizontal una vez que los animales hubieron realizado varios intentos fallidos de finalización

del test. A estos animales también se les premió con crema de chocolate, motivándoles así a intentarlo de nuevo en sesiones sucesivas.

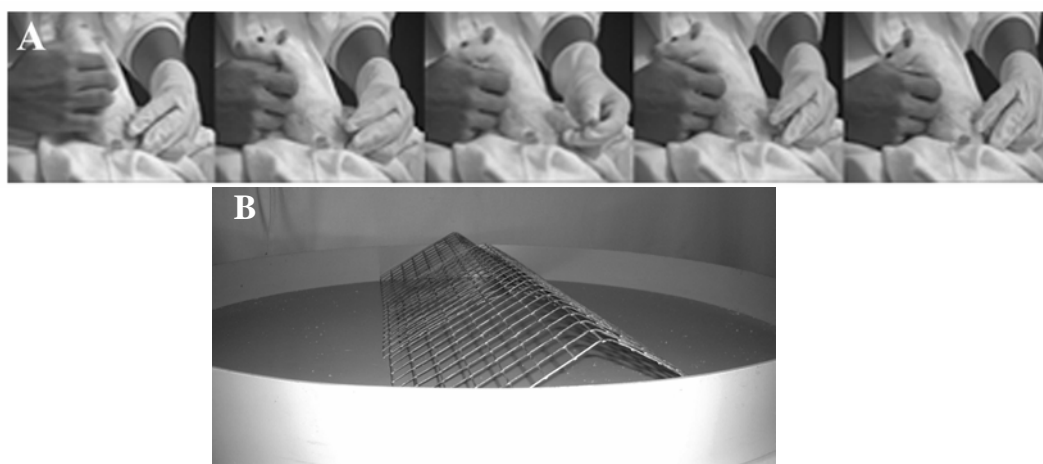
Después de cada cirugía se dejó a los animales recuperarse durante un mes antes de empezar los tests. En el caso de los animales trasplantados en la fase subaguda (un mes post-lesión), se les realizó el test inmediatamente antes de someterlos a la cirugía de trasplante para disponer así del dato funcional del primer mes post-lesión. Después de esta segunda cirugía (cirugía de trasplante) se dejó a los animales recuperarse durante un mes más. Y a los animales trasplantados en la fase crónica (4 meses post-lesión) también se les dejó recuperarse durante un mes después de la lesión y otro mes después de la cirugía de trasplante. Una vez cumplido el primer mes post-lesión en cada grupo, se evaluó la recuperación de la función motora voluntaria en todas las ratas semanalmente utilizando este test. El resultado sólo se consideró positivo cuando las ratas superaron un determinado nivel durante tres semanas.

El periodo de tiempo que seleccionamos para comparar la recuperación funcional entre los grupos SA y Cr, y con el grupo No-T fue entre el primer mes y el octavo después de la segunda cirugía (cirugía de trasplante). Se utilizó este intervalo de tiempo puesto que las ratas del grupo Cr sobrevivieron durante 8 meses antes del trazado, de este modo, disponemos del mismo número de meses para poder compararlos en ambos grupos. Todas las sesiones del test fueron grabadas y estos videos analizados para evaluar el grado de recuperación funcional.

## **VI.2. Test de comportamiento en campo abierto (BBB)**

También se utilizó el test de comportamiento en campo abierto Basso, Beattie y Bresnahan (BBB) (Basso *et al.*, 1995). Antes del test, se vació las vejigas puesto que el movimiento de las patas traseras a veces va acompañado de la contracción espontánea de la vejiga. El test consiste en permitir a cada animal moverse libremente en una caja circular (90cm de diámetro x 7 cm de altura de la pared) con una superficie lisa durante 4 minutos. Los tres examinadores (el co-director de esta tesis Fernando Santos, la técnico de laboratorio Luisa Juan Amo y yo misma) observaron los movimientos de las patas traseras de las ratas y le dieron una puntuación a la función locomotora de acuerdo con la escala del test BBB.

Tras una lesión medular completa, las ratas son capaces de moverse libremente en un campo abierto sin necesidad de utilizar sus patas traseras, e impulsando sus cuerpos con sus patas delanteras. En nuestro caso, hemos introducido una pequeña modificación al test clásico, introduciendo una rejilla doblada (en forma de tienda de campaña) (agujeros de 25 x 25 mm) en el centro del campo abierto circular. Las ratas fueron evaluadas con las dos versiones cada semana. Mediante esta modificación se pretendía comprobar si el contacto con dicha rejilla promovía algún tipo de movimiento reflejo tipo "stepping", tratando de discernir de este modo, los reflejos de los movimientos voluntarios. También se pretendía a su vez, motivar a los animales a utilizar sus patas traseras para poder pasar de un lado al otro de la rejilla.



**Figura 7. (A) Secuencia de video mostrando, de izquierda a derecha, los movimientos de flexo-extensión del tobillo izquierdo de una rata durante la rehabilitación diaria. (B) Caja circular utilizada en el test de comportamiento en campo abierto con la rejilla colocada en el centro del campo.**

En los diferentes tests (tanto en el test de la rampa como las dos versiones de campo abierto) participaron tres observadores. Todas las sesiones de tests fueron grabadas, y los examinadores también evaluaron la recuperación funcional viendo los vídeos. Las respuestas de las ratas sólo se tuvieron en cuenta cuando las conclusiones obtenidas *in situ* coincidieron con las obtenidas al revisar los videos.



## **VII. HISTOLOGÍA**

### **VII.1. Perfusión de los animales y procesamiento del tejido**

Los animales fueron perfundidos con suero salino fisiológico y después con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1M pH 7,4, y tanto las médulas espinales como el tronco del encéfalo y los cerebros fueron disecados y post-fijados durante 5 horas a 4° C. El tejido se sumergió en sacarosa al 30% en tampón fosfato 0,1M pH 7,4 durante 36 horas a 4° C y después se embebió en compuesto OCT, Tissue-Tek (Sakura).

El tronco del encéfalo y la corteza motora fueron cortados sagitalmente en un criostato (-20° C y secciones de 20 µm) y se recogieron secciones consecutivas en diferentes portaobjetos gelatinizados, de forma que en cada portaobjetos se encuentra una representación de la totalidad del tronco del encéfalo.

Las médulas espinales se cortaron longitudinalmente (sagitalmente, secciones de 20 µm) en un criostato, y todas las secciones se recogieron en portaobjetos consecutivos. Se obtuvieron 20 portaobjetos con una media de 8 secciones en cada uno, de modo que cada portaobjetos contiene la representación completa de la médula.

### **VII.2. Revelado del trazador mediante inmunohistoquímica frente a WGA**

Las neuronas cuyo axón había regenerado y fue capaz de atravesar la cicatriz y captar el trazador, fueron detectadas mediante Inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo frente a WGA. Esta tinción se llevó a cabo en una de cada cinco secciones de todo el tronco del encéfalo (una sección cada 100 µm de tejido) y de la corteza motora. Para el revelado del anticuerpo secundario contra WGA se utilizó Diaminobenzidina (DAB), de manera que la señal fue doblemente intensificada puesto que el DAB se utilizó para revelar al mismo tiempo el anticuerpo secundario contra WGA y la actividad HRP del trazador.

Los tejidos se lavaron tres veces con TBS-Tx (0,1%) pH = 8, 10 minutos cada vez a temperatura ambiente, y se incubaron durante 30 minutos en TBS-Tx (0,1%) - FBS (1%), seguido de una incubación durante toda la noche con el anticuerpo primario anti-WGA (1/250) (Vector Laboratories AS-2024), a 4° C. Después de lavar los tejidos 3 veces con TBS-Tx durante 5 minutos cada vez, se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario biotinilado IgG

conejo-anti-cabra (H+L), BA-5000 (1/200), se lavaron de nuevo tres veces 5 minutos cada vez con TBS-Tx y se incubaron con solución ABC de los laboratorios Vector (Vectastain Elite ABC Kit Standard, PK-6100) durante 90 minutos a temperatura ambiente. Se lavó las secciones dos veces con TBS-TX 0,05M pH = 8 y otras dos veces con Tris/HCl pH = 8 0,05M, con una duración de 10 minutos cada lavado, y se reveló con DAB (DAB substrate Kit for preoxidase de Laboratorios Vector, SK-4100) durante 2 minutos. Tras lavar las secciones tres veces, 10 minutos cada vez, con agua estéril, los tejidos fueron deshidratados y montados con DEPEX (SERVA).

### **VII.3. Inmunohistoquímica de las médulas espinales.**

Para la realización de la inmunohistoquímica frente a GFAP y Neurofilamento (NF) las secciones se lavaron con PBS 12,5 mM pH = 7,3, a temperatura ambiente durante 10 minutos cada lavado. Se incubaron entonces durante 30 minutos con PBS-Tx (0,1%)-FBS (1%) y después se incubaron durante toda la noche a 4° C con dos anticuerpos diferentes en PBS-Tx (0,1%)-FBS (1%): el anticuerpo policlonal de conejo frente a GFAP (Dako Z0334, 1/500) con la finalidad de marcar la astrogía reactiva y delimitar así la cicatriz glial, y el anticuerpo monoclonal de ratón frente a NF (Hybridoma Bank RT 97, 1/1500) para teñir los axones. Se realizaron controles mediante la omisión del anticuerpo primario. Al día siguiente, los tejidos se lavaron con PBS (3x10 minutos) y se incubaron durante 45 minutos en oscuridad a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios Texas Red de cabra frente a conejo (Jackson ImmunoResearch 111-075-144, 1/500) y Oregon Green de cabra frente a ratón (Molecular Probes O-6380, 1/500). Las secciones se montaron con Fluoromount (SouthernBiotech).

Las médulas de los animales utilizados para el estudio de la inocuidad del cemento dental sobre médulas espinales intactas se procesaron del mismo modo ya descrito, y la inmunohistoquímica se realizó siguiendo el mismo protocolo pero utilizando el anticuerpo primario de ratón anti-rata CD68 (Clone ED1 de Serotec MCA341R, 1/100) para detectar la presencia de macrófagos y el anticuerpo ya descrito frente a GFAP para la detección de astrogía reactiva.

## **VIII. MEDIDAS HISTOLÓGICAS**

### **VIII.1. Medida de la degeneración secundaria en la zona de la lesión**

Para poder medir la distancia entre la cicatriz GFAP-positiva distal y proximal en las médulas espinales (cuerpo principal de la cicatriz formado por componentes pobres en GFAP como son células fagocíticas y meníngeas), y el volumen de las cavidades, hemos utilizado la tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo frente a GFAP en una de cada 5 secciones de todo el grosor de la médula que fueron recogidas tal y como se describió anteriormente, para que de esta forma esté representado toda la región de la lesión. Mediante este anticuerpo pudimos diferenciar el tejido GFAP negativo (cicatriz meníngea) entre los dos muñones así como las cavidades presentes en ambos muñones. Se tomaron imágenes de los tejidos a una magnificación de 2,5X desde el epicentro de la lesión utilizando una cámara digital Leica (Leica DFC350 FX) conectada a un microscopio Leica y fueron analizadas mediante el programa Leica IM 50. Se midió el área del tejido GFAP negativo en cada sección y el área de las cavidades en los muñones, de modo que se obtuvo un valor medio de área de degeneración por sección para cada médula espinal (suma de las áreas GFAP-negativas de todas las secciones analizadas / número de secciones analizadas). El volumen total de degeneración se obtuvo multiplicando este valor medio de área por el grosor de cada sección (20  $\mu\text{m}$ ) y por el número total de secciones que se obtuvieron de cada médula. Como medida se utilizó el volumen por unidad de superficie para facilitar el manejo de los datos y la comparación con otros estudios y evitar la variabilidad debida por ejemplo, a la edad, el peso o la cepa de animales utilizados, que podrían influir sobre el tamaño de la médula espinal. Se calculó el volumen por unidad de superficie dividiendo el volumen total de degeneración entre el área transversal de la medula espinal (Fig. 13 A). En la práctica, la superficie (o área) transversal de la médula está cortada cada 20  $\mu\text{m}$ , y podemos considerar que este área medular es la suma del área de cada uno de estos rectángulos resultantes ( $\Sigma$  la altura de cada rectángulo x 20  $\mu\text{m}$ ). Puesto que el grosor de una sección (20  $\mu\text{m}$ ) es una constante que aparece tanto en el cálculo del volumen total degenerado, como en el cálculo del área transversal, resulta matemáticamente demostrable que el volumen degenerado por unidad de

superficie puede calcularse dividiendo el área media degenerada entre la altura media dorso-ventral de las secciones analizadas.

### **VIII.2. Cuantificación de la presencia de axones en la zona de la lesión**

Se cuantificó el número de axones totales presentes en la zona de la lesión, concretamente en la cicatriz negativa, utilizando el programa de análisis de imagen Metamorph. Para ello, en las secciones medulares marcadas con GFAP se delimitó el área de cicatriz GFAP negativa (delimitada por el borde de cicatriz GFAP positiva), y en esta región se calculó el porcentaje de píxeles que presentaron marcaje frente a neurofilamento. Se utilizó el porcentaje medio de píxeles marcados con neurofilamento por rata para realizar las comparaciones entre grupos.

### **VIII.3. Cuantificación de las neuronas regeneradas**

Para la cuantificación del número de neuronas marcadas con HRP-WGA se utilizó una sección de cada cinco de todo el tronco del encéfalo y de la corteza motora, para así tener una representación de la totalidad. Se contó manualmente el número total de somas neuronales en los diferentes núcleos que dan origen a haces descendentes como son en locus coeruleus, la formación reticular, el rafe, el núcleo vestibular y el núcleo rojo, en las secciones del tronco del encéfalo que habían sido reveladas, utilizando un microscopio Leica. Para la localización de los diferentes núcleos objeto de estudio se utilizó el atlas de Paxinos y Watson, "The rat brain in stereotaxic coordinates (1998)". Se tomó imágenes de estos tejidos a una magnificación de 10x con una cámara unida al microscopio (leica DFC300 FX).

## **IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico SPSS. El análisis estadístico de la recuperación funcional y del número de neuronas regeneradas se realizó mediante los tests no-paramétricos de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney, debido al pequeño tamaño de las muestras ( $n < 10$ ) y a que el tipo de dato es ordinal en algunos casos, como en los tests de recuperación funcional. Se realizaron análisis de regresión lineal con la finalidad de encontrar posibles

correlaciones entre la recuperación funcional y el número de neuronas que regeneraron su axón en cada animal. Para obtener una estimación de la progresión a lo largo del tiempo de la recuperación funcional de cada rata, se le asignó una puntuación. Esta puntuación se calculó sumando los niveles alcanzados por la rata en los diferentes meses. Estas puntuaciones también se correlacionaron mediante regresión lineal con el número de neuronas regeneradas en cada individuo. Además se analizó la posible correlación entre el volumen por unidad de superficie de la cicatriz meníngea y de los quistes, con la recuperación funcional y con el número de neuronas marcadas en el tronco del encéfalo.

Se determinó si existían diferencias significativas entre las medias aritméticas de los resultados observados en los cultivos de roedores y macacos a los diferentes tiempos y condiciones (concentraciones bajas y altas de oxígeno, antes y después de congelación-descongelación, etc.) mediante los mismos tests no paramétricos de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney. En general, todos los datos se presentan como la media  $\pm$  ESM. Se consideró que las diferencias eran significativas para valores de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

## **I. RECUPERACIÓN FUNCIONAL DE RATAS PARAPLÉJICAS Y REGENERACIÓN AXONAL EN SUS MÉDULAS ESPINALES MEDIANTE TRASPLANTE DE OEG EN LA FASE SUBAGUDA Y CRÓNICA DE LA LESIÓN**

### **I.1. Recuperación funcional de ratas parapléjicas**

A partir del primer mes post-lesión se empezó el estudio de la recuperación del movimiento voluntario de las patas traseras de las ratas, mediante los tests de la rampa inclinada y de comportamiento en campo abierto (test BBB). De este modo se permitió a las ratas recuperarse durante un mes después de cada cirugía. En el caso del grupo de animales que se trasplantó en la fase subaguda (SA) (un mes post-lesión), se realizaron los tests inmediatamente antes de someterlos a la segunda cirugía (cirugía de trasplante), para poder disponer del dato de la evolución funcional durante el primer mes post-lesión. Después de las cirugías de trasplante se dejó otro mes de recuperación a estos animales. En el caso del grupo trasplantado en la fase crónica (Cr) (cuatro meses post-lesión), los tests se iniciaron un mes post-lesión, y después de la cirugía de trasplante se les dejó también recuperarse durante un mes antes de seguir con el estudio funcional.

En cuanto al grupo de animales parapléjicos no trasplantados (No-T), no existen diferencias de recuperación funcional ni histológicas entre los resultados de las ratas con lesión medular completa inyectadas con medio de cultivo tras un mes o tras 4 meses ( $p = 0,794$  y  $p = 0,770$  respectivamente). Esto indica que el abordaje quirúrgico, la eliminación del tejido cicatricial formado externamente a la médula, y la reexposición de los muñones medulares, no ocasiona ningún daño adicional a la médula ya que de ser así comenzaría a haber diferencias entre los animales de ambos grupos a partir del primer mes tras lesión (fecha de la cirugía del grupo subagudo). Además, la falta de diferencias entre grupos indica también que la progresión y la evolución de la lesión es la misma independientemente de cuándo se haga el abordaje y de si se inyecta medio de cultivo o no. Esto es lógico, ya que como es bien sabido, el medio de cultivo es inocuo y no contiene ningún factor promotor de la reparación medular, por ello muchos autores lo utilizan en sus animales control.

Al no presentar diferencias, estos animales han sido considerados como un solo grupo único (control no trasplantado, No-T) para el análisis conductual e histológico ( $n = 6$ ).

Para la evaluación del efecto de los trasplantes de OEG, se utilizaron los datos conductuales obtenidos a partir del primer mes después del trasplante en cada grupo (SA y Cr) y se comparó con la evolución de los animales no trasplantados (No-T) tras el mismo periodo de paraplejía. Es decir, el grupo SA un mes post-trasplante lleva dos meses de paraplejía y el grupo Cr un mes tras el trasplante lleva 5 meses de evolución de la lesión. De modo que los animales del grupo SA fueron comparados con los No-T desde el segundo mes post-lesión, que corresponde con el primer mes post-trasplante para el grupo SA, mientras que el grupo Cr se comparó con los No-T desde el quinto mes post-lesión, que es el primer mes tras el trasplante para el grupo Cr (Fig. 10).

Durante el primer mes post-lesión del grupo SA y los 4 primeros meses post-lesión del grupo Cr estas ratas se comportaron del mismo modo que los animales No-T, sin presentar diferencias significativas en la recuperación funcional con estos animales. Este resultado es lo que cabría esperar puesto que estos animales todavía no habían recibido los trasplantes de OEG durante esos meses.

Tras la sección completa de la médula espinal, todos los animales (trasplantados y No-T) mostraron una parálisis flácida completa en las patas traseras por lo que se movían impulsándose con sus patas delanteras arrastrando las traseras.

### *1.1.1. Evaluación de la recuperación del movimiento voluntario mediante el test de la rampa inclinada*

#### Grupo trasplantado un mes después de la lesión (fase subaguda)

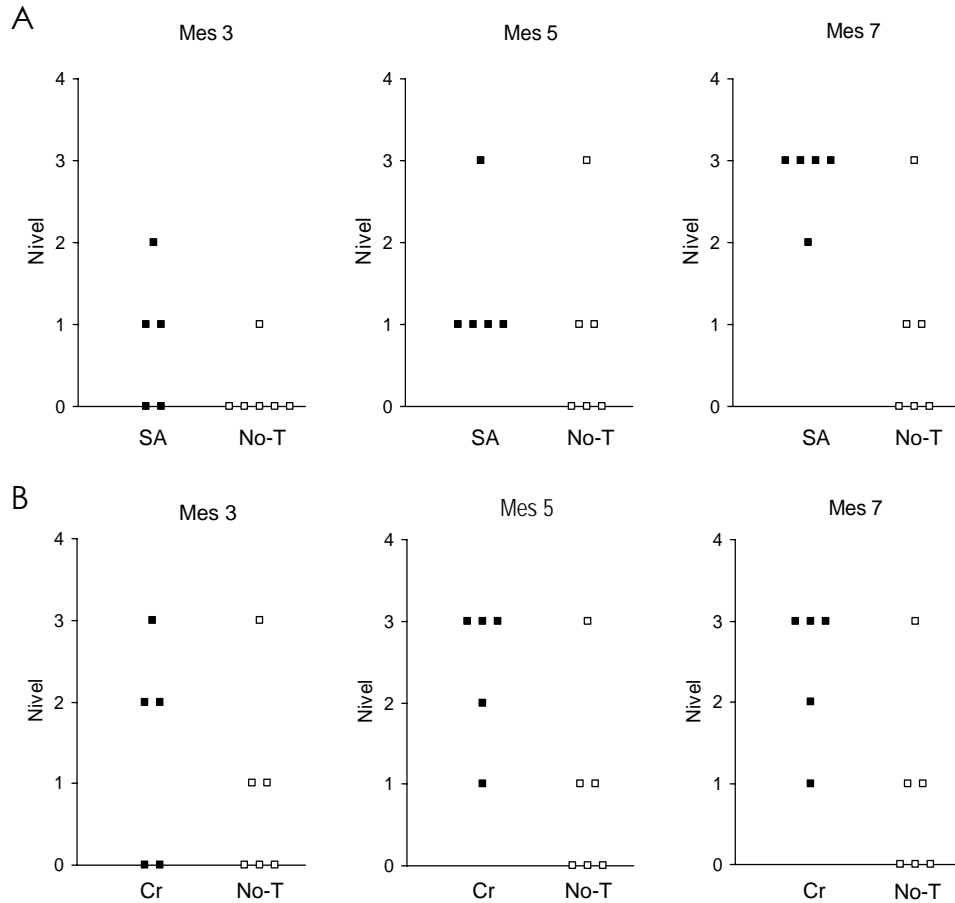
El efecto del trasplante de OEG sobre la recuperación motora se evaluó semanalmente desde el primer mes después del trasplante hasta el final del periodo de supervivencia en todos los grupos (Fig. 8). Todos los animales trasplantados del grupo subagudo (SA) superaron el test de la rampa, y mostraron una recuperación funcional significativa ( $p < 0,001$ ), tanto con respecto al tiempo post-trasplante como con respecto al grupo No-T. Un mes después de la lesión, y



justo antes de recibir el trasplante, se evaluó la recuperación funcional de todas las ratas, SA y No-T. Ninguna de ellas fue capaz de superar el nivel más bajo del test de la rampa. Un mes después del trasplante (dos meses después de la lesión) se repitió el test con el mismo resultado. A partir del segundo mes después del trasplante se empezaron a observar resultados positivos en los animales. En ese momento, dos de los cinco animales del grupo SA superaron el nivel 1 (40% de las ratas). Tres meses después del trasplante, una de estas dos ratas superó el nivel 2, y una tercera rata alcanzó el nivel 1. En el mes quinto, todas las ratas del grupo SA eran capaces de superar algún nivel del test. Una de ellas (20%) superó el nivel 3 y las otras cuatro el nivel 1 (80%). En comparación, en el segundo mes, uno de los seis animales No-T (16,7%) superó el nivel 1, sin mostrar cambios en el siguiente mes, pero en el cuarto mes, otra rata No-T superó el nivel 1. Cinco meses después de la inyección de medio, la primera rata No-T mencionada (16,7%) superó el nivel 3, dos ratas (33,3%) pasaron el nivel 1 y las otras tres No-T (50%) no fueron capaces de superar ningún nivel de la rampa. Las ratas No-T no mostraron ninguna recuperación funcional desde el quinto mes post-inyección (seis meses post-lesión) en adelante, mientras que los animales del grupo SA siguieron con su recuperación, y en el mes 7 después del trasplante de OEG, alcanzaron su máxima recuperación funcional, cuatro de ellas (80%) alcanzaron el nivel 3, y una (20%) el nivel 2 (Fig. 8 A).

La comparación mes a mes de la evolución funcional mostró diferencias significativas entre los grupos SA y No-T desde el mes seis post-trasplante hasta el final del experimento (mes 6:  $p = 0,029$ , mes 7 y posterior:  $p = 0,020$ ).

Además, el desarrollo de la evolución funcional del grupo trasplantado SA fue estadísticamente significativo en el mes quinto con respecto al primer mes ( $p = 0,004$ ) y el segundo mes post-trasplante ( $p = 0,042$ ), mostrando una recuperación funcional dependiente del tiempo, que siguió aumentando hasta el séptimo mes ( $p = 0,004$  vs mes 1;  $p = 0,006$  vs mes 2), momento en el que también fue significativo respecto al tercer y cuarto mes ( $p = 0,009$  en ambos). En comparación, los cambios en la evolución funcional en el grupo No-T no fueron estadísticamente significativos, y no mostraron una recuperación progresiva a lo largo del tiempo.



**Figura 8. (A, B) Niveles alcanzados en el test de la rampa inclinada por las ratas del grupo no-trasplantado y trasplantado en fase subaguda (A), y no-trasplantado y trasplantado en fase crónica (B), a diferentes tiempos post-trasplante. La recuperación funcional de cada grupo trasplantado fue significativamente superior a la del grupo No-T (SA:  $p < 0,001$  y Cr:  $p = 0,001$ ). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas desde el mes sexto hasta el final del experimento (mes 6:  $p = 0,029$ , mes 7 y 8:  $p = 0,020$ ) para las ratas del grupo SA, y en el mes 7 y 8 ( $p = 0,045$ ) para las del grupo Cr. No hubo diferencias significativas entre los grupos SA y Cr, y ambos mostraron una recuperación progresiva significativa, que no se observó en los animales del grupo No-T. Aunque la recuperación en los grupos SA y Cr empezó tras el primer mes post-trasplante, esta diferencia empezó a ser significativa tras el quinto ( $p = 0,004$ ) y el cuarto mes ( $p = 0,021$ ) respectivamente y continuó aumentando hasta el séptimo mes.**

Estos resultados sugieren la existencia de cierto grado de recuperación espontánea en el grupo No-T que no fue significativo y se detuvo en el quinto mes post-inyección (sexto mes post-lesión), mientras que las ratas trasplantadas un mes después de la lesión (SA) presentaron una recuperación paulatina (que continuó tras el quinto mes post-trasplante), mostrando diferencias significativas respecto a los niveles alcanzados a tiempos tempranos y respecto al grupo No-T, debido a los efectos de la OEG (Fig. 8 A).

#### Grupo trasplantado cuatro meses tras la lesión (fase crónica)

Durante los cuatro meses entre la lesión y el trasplante se evaluó la evolución funcional mediante el test de la rampa en todos los animales de los grupos No-T y trasplantados en la fase crónica (Cr). Los dos grupos se comportaron de forma similar, sin mostrar diferencias significativas entre ellos en el periodo pre-trasplante. Un animal No-T y dos Cr mostraron cierta recuperación espontánea antes de ser trasplantados, y fueron capaces de superar el nivel más bajo de la rampa en el cuarto mes tras la lesión (justo antes del trasplante para el grupo Cr).

Después del trasplante de OEG, el grupo Cr mejoró significativamente su función motora con respecto al tiempo ( $p = 0,016$ ) y al grupo No-T ( $p = 0,002$ ). Dos meses después del trasplante (seis meses post-lesión), tres de las cinco ratas Cr alcanzaron el nivel uno del test de la rampa, y una de ellas progresó hasta el nivel 3 en un mes más. En este punto, las otras dos ratas que superaban el nivel uno, mejoraron hasta el nivel 2 y en el mes quinto post-trasplante hasta el nivel 3. Estas dos ratas que superaron el nivel 2 al tercer mes después del trasplante y el nivel 3 al quinto mes, fueron los mismos animales que mostraron cierto grado de recuperación espontánea en la etapa pre-trasplante. Ya en el primer mes post-trasplante continuaron siendo capaces de superar el nivel uno. Esto demuestra que la técnica de trasplante de OEG utilizada no perjudicó ni interfirió en absoluto en la recuperación funcional espontánea que estos animales presentaban antes de ser trasplantados, sino que por el contrario, promovió una mayor recuperación que la que presentaron los animales control no trasplantados a los que sólo se les inyectó medio de cultivo. Las otras dos ratas Cr pasaron el nivel 1 tras cuatro meses post-trasplante y una de ellas alcanzó el nivel 2 en el séptimo mes. En comparación, dos meses después del trasplante (seis meses post-lesión) dos de los seis animales No-T

## Resultados

pasaban el nivel 1 y una rata el nivel 3, pero ninguna de ellas alcanzó nunca niveles superiores. Por lo tanto, todas las ratas del grupo Cr (100%) fueron capaces de superar el test de la rampa 4 meses después del trasplante, y en el séptimo mes alcanzaron su máxima recuperación funcional. Tres de las cinco ratas (60%) alcanzaron el nivel 3, una (20%) el nivel 2 y la otra (20%) el nivel 1 (Fig. 8 B).

La recuperación funcional que presentaron las ratas trasplantadas (Cr) respecto a las No-T fue estadísticamente significativa en el mes 7 y 8 ( $p = 0,045$ ), y fue casi significativa en los meses 5 y 6 ( $p = 0,066$ ). No se observó ninguna recuperación significativa en animales No-T a ningún tiempo post-lesión, y mantuvieron los mismos niveles desde el segundo mes post-inyección (seis meses post-lesión) en adelante. Por el contrario, la recuperación funcional progresiva iniciada en el segundo mes que se observó en las ratas Cr, empezó a ser significativa desde el mes cuarto con respecto al primero ( $p = 0,021$ ) y el segundo mes post-trasplante ( $p = 0,033$ ). Estas diferencias continuaron siendo significativas y aumentaron hasta el séptimo mes ( $p = 0,013$  vs mes 1;  $p = 0,016$  vs mes 2), mostrando una recuperación dependiente del tiempo en el grupo Cr, que no se observó en el grupo No-T. Al igual que en el grupo SA, el trasplante de OEG en las ratas Cr promovió una recuperación funcional más allá de la recuperación espontánea observada en los animales sin trasplante, con una evolución favorable, progresiva y significativa estadísticamente.



**Figura 9.** Fotogramas de un video que muestra una rata trasplantada en la fase crónica de la lesión, superando el nivel tres de la rampa inclinada. Se muestran los movimientos voluntarios de las patas traseras soportando su peso e impulsando todo el cuerpo para alcanzar la plataforma horizontal.

### Comparación entre los grupos trasplantados uno y cuatro meses después de la lesión

Los grupos SA y Cr recibieron los trasplantes de OEG uno y cuatro meses después de la lesión respectivamente. Independientemente del retraso del trasplante respecto a la lesión, estas ratas fueron recuperando su función motora durante los siguientes siete meses que siguieron al trasplante de OEG. En este tiempo los dos grupos alcanzaron el máximo de su recuperación funcional, presentando estados de recuperación muy similares: el nivel 3 fue el máximo alcanzado para cuatro ratas SA y tres Cr, el nivel 2 lo fue para una rata SA y una Cr, y el nivel 1 fue el máximo superado para la rata restante del grupo Cr. Sin embargo, la recuperación espontánea de los animales control No-T se detuvo en el mes quinto o segundo tras la segunda cirugía (inyección de medio tras 1 mes o 4 meses respectivamente), y este periodo se corresponde con el mismo tiempo post-lesión: seis meses. Este punto final de recuperación espontánea fue el mismo para todos los animales No-T que recibieron la inyección de medio, independientemente de si se inyectó el medio tras uno o cuatro meses post-lesión, de modo que esta recuperación no se vio afectada por la segunda cirugía. Sin embargo, la evolución positiva de los animales trasplantados con OEG fue progresiva a partir de la segunda cirugía, comenzando un nuevo periodo de recuperación de siete meses que fue debido a dicho tratamiento.

No hubo diferencias significativas entre la recuperación funcional de los grupos SA y Cr a ningún tiempo post-trasplante ( $p$  entre 0,1 y 0,635). Por otro lado, la evolución temporal de sus recuperaciones funcionales fue muy similar. En los dos grupos, el primer cambio en la ejecución del test con respecto al momento del trasplante se produjo en el segundo mes tras inyectar OEG. Todas las ratas SA y Cr alcanzaron, al menos, el mínimo nivel de recuperación en el quinto y cuarto mes respectivamente, y este fue el primer punto temporal para los dos grupos en el que la recuperación funcional empezó a ser significativa respecto a esta recuperación en los meses primero y segundo. Por lo tanto, y dado que los dos grupos alcanzaron una recuperación máxima similar y tras el mismo periodo de tiempo, y que no hay diferencias significativas entre la recuperación de los grupos SA y Cr, los beneficios de la OEG parecen ser independientes del retraso en el trasplante entre uno y cuatro meses.

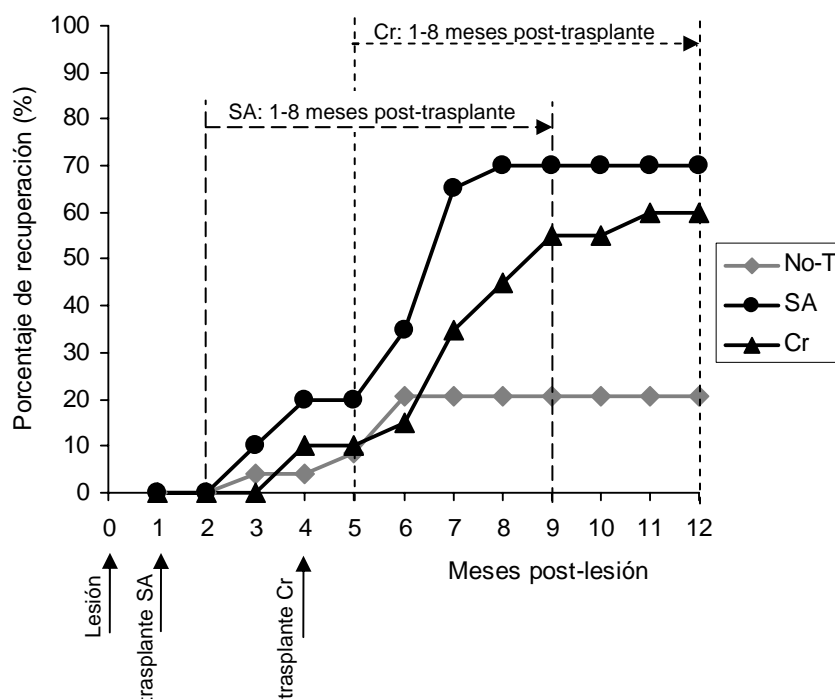


Figura 10. Evolución de la recuperación funcional en todos los grupos desde el primer mes post-lesión hasta el final del periodo de supervivencia (12 meses). Cada punto representa el porcentaje de recuperación funcional alcanzado por los animales de cada grupo. Las líneas discontinuas delimitan los periodos utilizados para comparar la evolución funcional entre los grupos control y trasplantados (entre el primer mes y el octavo post-trasplante en cada caso). — — — Periodo utilizado para comparar SA con el grupo No-T. - - - - Periodo utilizado para comparar Cr con el grupo No-T.

Los animales del grupo No-T (rombos grises) mostraron una recuperación discreta y no significativa desde el mes tercero post-lesión hasta el mes sexto. No mostraron ninguna recuperación desde el mes sexto hasta el final del estudio. Esta recuperación espontánea no fue significativa a lo largo del tiempo ni en ninguno de los periodos post-lesión.

El grupo SA (círculos negros) empezó a mostrar recuperación dos meses después del trasplante de OEG (tres meses tras la lesión) y continuó recuperando significativamente hasta el mes séptimo después del trasplante (ocho post-lesión), momento en el que todos los animales alcanzaron su máximo nivel de recuperación.

El grupo Cr (triángulos negros) se comportó de la misma forma que el grupo No-T antes de recibir el trasplante de OEG, mostrando una ligera y no significativa recuperación espontánea durante los cuatro meses previos al trasplante. Dos meses después del trasplante empezaron a

**mejorar y continuaron con una recuperación significativa hasta el séptimo mes post-trasplante (once meses post-lesión). Este grupo también alcanzó su nivel máximo de recuperación durante el séptimo mes.**

Estos resultados funcionales, en el caso de los animales trasplantados, no mostraron diferencias significativas con la recuperación observada en un estudio previo de nuestro laboratorio (Ramon-Cueto *et al.*, 2000), en el que la OEG fue trasplantada en la fase aguda de la lesión ( $p > 0,606$ ). Además, cuando se compararon los resultados obtenidos por los animales trasplantados de cada estudio (éste y el citado previo) con los controles del otro experimento (de forma cruzada), se observaron diferencias significativas en ambos casos ( $p < 0,02$ ).

En conclusión, los trasplantes de OEG promueven la recuperación funcional de ratas parapléjicas independientemente de si se realizan en la fase aguda, subaguda o crónica de la lesión, y además, el grado de recuperación es el mismo, estadísticamente, en los tres casos. Esta posibilidad de retrasar el trasplante de OEG respecto a la lesión permite disponer del tiempo suficiente para obtener los bulbos, cultivar, expandir y preparar las células en el caso del traslado de esta terapia a la clínica, permitiendo la realización de trasplantes autólogos, y proporcionando tiempo para la estabilización del paciente antes de la intervención.

Para superar cualquiera de los niveles del test de la rampa inclinada, las ratas tuvieron que ser capaces de dar pasos voluntariamente, de colocar las patas en los peldaños y de impulsarse con sus patas traseras para trasladar todo su cuerpo a la plataforma lisa horizontal. Por lo tanto, todas las ratas trasplantadas con OEG ( $n = 10$ ), y tres de las seis ratas No-T presentaron movimiento voluntario de sus patas traseras, colocación plantar y soporte de su peso corporal. Al final del estudio, independientemente del momento del trasplante, de todas las ratas trasplantadas con OEG (SA y Cr), el 70% fueron capaces de alcanzar la plataforma horizontal superando el nivel 3, 10% superaron el nivel 2 y el 20% el nivel 1. De todos los animales No-T, tan sólo el 16,7% superó el nivel 3; el 33,3% el nivel 1 y el 50% no fue capaz de superar ni el mínimo nivel de dificultad.

### *1.1.2. Test de comportamiento en campo abierto (BBB)*

Las ratas con lesión completa de la médula espinal fueron capaces de moverse libremente en el campo abierto impulsándose con sus patas delanteras sin necesidad de mover sus patas traseras. En nuestro caso, hemos utilizado el test de comportamiento en campo abierto para tratar de averiguar si realmente se trata de un test apropiado para el estudio de la recuperación funcional de ratas con lesión completa de la médula espinal. Aunque este test fue diseñado para su aplicación en animales con lesión incompleta de la médula espinal (Basso *et al.*, 1995), la escasez de tests especialmente diseñados para el estudio funcional en animales con lesión medular completa hace que este sea uno de los tests más utilizados en la literatura científica, tanto en estudios de lesión incompleta como completa. Varios autores ponen en duda su aplicabilidad en animales con lesión medular completa (Coumans *et al.*, 2001; Antri *et al.*, 2002; Deumens *et al.*, 2005; (Deumens *et al.*, 2006; Rossignol, 2006) puesto que estos animales suelen presentar una recuperación funcional mucho menor y el test del BBB no parece ser suficientemente sensible para detectar diferencias en el caso de lesiones severas.

En nuestro caso, las medias de las puntuaciones máximas alcanzadas por los animales al final del periodo de estudio fueron de  $6,6 \pm 0,8$  para el grupo SA,  $7,3 \pm 0,7$  para Cr y  $6,0 \pm 0,8$  para los animales No-T, que corresponde, según la escala descrita para este test, con un extenso movimiento de las tres articulaciones de las patas traseras en las ratas trasplantadas y movimiento extenso de dos articulaciones y leve de la tercera para los animales no trasplantados. Estas pequeñas diferencias no fueron significativas estadísticamente en ninguno de los meses, tanto los animales trasplantados como los no trasplantados obtuvieron puntuaciones similares en la escala del BBB ( $p < 0,750 - 0,915$  para SA y  $p < 0,138 - 0,914$  para Cr). Además, en nuestro estudio hemos introducido una modificación a este test colocando una rejilla doblada (Fig. 7 B) en el centro del campo abierto circular. Mediante esta modificación se pretendía comprobar si el contacto con la rejilla promovía algún tipo de movimiento reflejo tipo "stepping", pudiendo así discernir entre reflejos y movimientos voluntarios, y por otro lado, motivar a los animales a mover sus patas traseras de manera que tuvieran que subir y bajar la rejilla para pasar de un lado a otro del campo. Cuando analizamos los resultados obtenidos con esta modificación del test del BBB, las puntuaciones alcanzadas



fueron algo superiores a las obtenidas con el test clásico para cada grupo, pero sin mostrar diferencias significativas en ningún grupo, ni en ningún mes entre los dos tipos de test ( $p < 0,131 - 0,917$  para el grupo SA,  $p < 0,169 - 0,916$  para Cr y  $p < 0,051 - 0,737$  para el grupo No-T). Los valores medios obtenidos al colocar la rejilla en el centro fueron de  $8,1 \pm 0,9$  para SA,  $8,5 \pm 0,8$  para Cr y  $7,3 \pm 0,8$  para No-T, que corresponden con un movimiento extenso de las tres articulaciones en las ratas No-T y la colocación plantar sin soportar el peso corporal en las ratas SA y Cr. Pero estas diferencias tampoco resultaron ser estadísticamente significativas entre los animales trasplantados y no trasplantados ( $p < 0,146 - 0,913$  para SA y  $p < 0,066 - 1,000$  para Cr). En la figura 11 se muestra la evolución de las puntuaciones obtenidas por los animales en la escala del BBB desde el mes quinto después de la lesión hasta el décimo, momento a partir del cual no se observó ningún cambio en ningún grupo hasta el final del estudio. Se muestran las puntuaciones obtenidas cada dos semanas, y como se puede observar, los animales mostraron una evolución muy similar independientemente del tratamiento que recibieron, y del momento en el que dicho tratamiento fue aplicado.

Según la escala de este test (BBB), una puntuación de 0 corresponde con la ausencia de movimiento voluntario y una puntuación de 21 indica locomoción normal. Cuando un animal presenta una puntuación de 14 indica la correcta colocación plantar, soporte de su peso y coordinación completa entre sus patas delanteras y traseras. Al no estar los animales motivados a mover sus patas traseras ya que pueden explorar el campo moviéndose con las delanteras, no se observan diferencias entre los animales control y los trasplantados, ni con el test clásico ni con nuestra modificación. Además, la introducción de la rejilla en el centro del campo abierto no provocó la aparición de reflejos tipo "stepping" ni tampoco obligó a los animales a mover sus patas traseras, puesto que, también en este caso, fueron capaces de moverse libremente con las patas delanteras. Estos animales que se sabe, son capaces de soportar su peso en el test de la rampa inclinada, no lo hacen en el campo abierto porque no "están forzados" a hacerlo ni lo necesitan para desarrollar su actividad exploratoria, que es lo que les motiva a moverse. Por lo tanto, como en el caso de ratas con lesión medular completa, la recuperación funcional que cabe esperar es menor y más lenta que en el caso de animales con lesión incompleta, y la escala utilizada en el test del BBB no parece ser

## Resultados

suficientemente sensible para detectar diferencias en el caso de animales con lesiones severas.

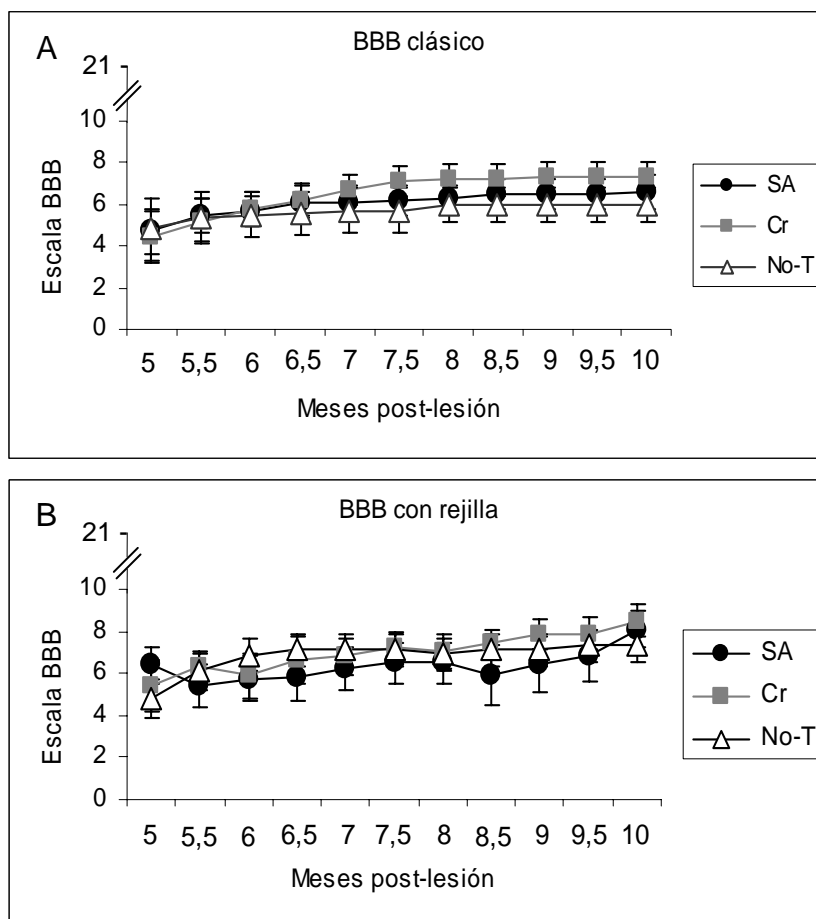


Figura 11. Puntuaciones obtenidas por los animales de los tres grupos (SA, Cr y No-T) según la escala del BBB, utilizando el test original (A) y el test adaptado con rejilla (B). En las dos gráficas se muestra la evolución de estas puntuaciones desde el mes quinto hasta el mes décimo post-lesión, momento a partir del cual ningún animal (independientemente del grupo) mostró cambios en este test. Se muestran los datos obtenidos cada dos semanas. Como se puede observar, los animales mostraron una evolución muy similar, independientemente del tratamiento aplicado (trasplante de OEG o inyección de DMEM) y del punto temporal en que dicho tratamiento fue aplicado (SA o Cr), y no se observaron diferencias significativas en ningún punto temporal. En el BBB con rejilla (B), las puntuaciones fueron algo superiores pero sin mostrar tampoco diferencias significativas en ningún momento.

**I.2. Medida del volumen de degeneración secundaria en las médulas lesionadas**

La lesión en el SNC es el resultado de los dos procesos descritos, el daño físico primario y la subsiguiente degeneración secundaria, que suele continuar durante días o meses después de la lesión inicial. Esta degeneración secundaria y la cicatriz que se forma, son los dos principales obstáculos a la regeneración de los axones en la médula espinal lesionada. La degeneración secundaria, normalmente da lugar a muerte celular y a la formación de cavidades en las áreas adyacentes a la lesión primaria.

Este es el motivo de que en muchos estudios se haya utilizado el volumen de la degeneración secundaria o de la cicatriz meníngea entre los bordes de los muñones proximal y distal de la médula espinal seccionada, como medida de la efectividad de diferentes tratamientos como protectores frente a dicha degeneración (Cheng y Olson, 1995; Liu *et al.*, 2003; Verdu *et al.*, 2003; Nieto *et al.*, 2005).

En nuestro estudio, a nivel macroscópico se observó un tejido blanco y opaco en la zona de la lesión uniendo los dos muñones, en todas las ratas que recibieron trasplante (SA y Cr) (Fig. 12 A y B). En comparación, en el grupo de animales No-T el tejido que unía los dos muñones espinales se mostró como una fina membrana translúcida (Fig. 12 C). Es decir, ya a nivel macroscópico parecía existir neoformación tisular entre los muñones de los animales trasplantados.

Esta observación macroscópica se corresponde con nuestros hallazgos microscópicos. Mediante inmunohistoquímica frente a GFAP marcamos la astroglia reactiva y delimitamos así la cicatriz glial. En los extremos de los dos muñones, observamos inmunoreactividad fuerte frente a GFAP tanto en la médula espinal de los animales trasplantados como no trasplantados, indicando que la OEG no inhibe la activación de la astroglia. Los dos bordes GFAP positivos se hallaron unidos por tejido negativo frente a GFAP (cicatriz meníngea). La interrupción de tinción frente a GFAP en la zona de la lesión demuestra que las lesiones fueron completas en todos los animales (Fig. 12 D, F).

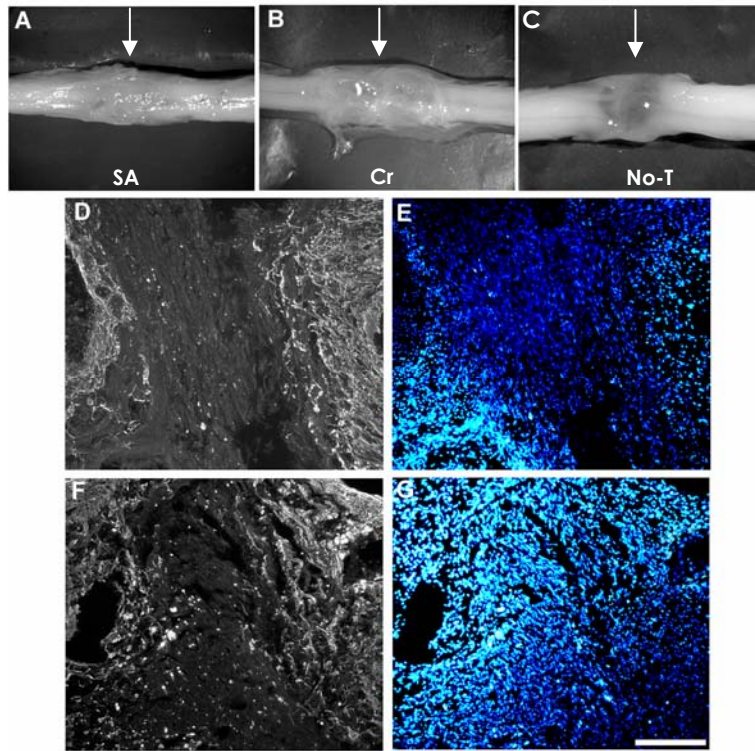


Figura 12. (A-C) Aspecto dorsal de la región de la lesión, 12 meses después de realizar una sección completa en animales trasplantados del grupo SA (A), Cr (B) y no-trasplantados (C). En los dos grupos trasplantados (A, B) los muñones rostral y caudal aparecieron unidos por un tejido blanco y opaco (flecha). En la médula espinal de los animales No-T (C), los dos muñones medulares estaban unidos por una membrana translúcida (flecha). Izquierda = rostral, derecha = caudal.

(D-G) Microfotografías de las secciones de las mismas médulas espinales trasplantadas con OEG mostrando la zona de la lesión de animales SA (D, E) y Cr (F, G). La cicatriz glial se marcó con anti-GFAP (D, F), y la OEG se visualizó mediante el marcaje con Hoechst (E, G). Nótese la región GFAP-negativa entre los dos muñones medulares GFAP-positivos en (D, F) y la OEG invadiendo esta región por completo (E, G).

En todas las imágenes microscópicas: izquierda = rostral, derecha = caudal. Barra de escala (D, G) = 50  $\mu$ m.

Además, los animales trasplantados mostraron la presencia de OEG marcada con Hoechst invadiendo completamente la zona de la lesión (Fig. 12 E, G). La OEG migró desde los puntos de inyección y se mezcló con células GFAP-positivas tanto en la cicatriz rostral como caudal, demostrando, como ya se había observado en otros trabajos, que el tejido cicatricial no impide la migración de la OEG (Fig. 12 E - G).

Para poder cuantificar en qué medida la OEG favoreció una menor degeneración secundaria en la zona de la lesión, calculamos el volumen por unidad de superficie del tejido delimitado por la cicatriz astrocítica GFAP-positiva, incluyendo tanto el tejido GFAP negativo (cicatriz fibrosa) como las cavidades que se formaron en algunos casos en ambos muñones. Como medida se utilizó el volumen por unidad de superficie para facilitar el manejo de los datos y la comparación con otros estudios en los que pudiera variar el tamaño de la médula por diferentes motivos (diferente especie, edad, peso, etc.)(Fig. 13).

La media de los volúmenes obtenidos por unidad de superficie fue significativamente inferior en los animales trasplantados (SA y Cr) respecto a los No-T ( $p = 0,016$  para SA y  $p = 0,027$  para Cr), con volúmenes medios por unidad de superficie de  $2,890 \pm 0,377$  mm en el grupo de animales No-T,  $1,545 \pm 0,177$  mm en las médulas espinales de las ratas SA y  $1,456 \pm 0,261$  en Cr (Fig. 13 C). Por lo tanto, el volumen de la degeneración secundaria, medido en función del volumen de la cicatriz GFAP-negativa y de las cavidades formadas, fue prácticamente el doble en los animales que no recibieron trasplante de OEG respecto a los trasplantados. Una vez más, no se observaron diferencias significativas entre el volumen de degeneración en el grupo SA y en el grupo Cr ( $p = 1,000$ ).

Por lo tanto, el trasplante de OEG favorece una menor degeneración en la zona de la lesión cuando es trasplantado en las fases subaguda y crónica. En el caso del trasplante tras 4 meses de la lesión, esta OEG podría estar favoreciendo tanto la disminución de muerte celular (que todavía perdura) como la neoformación tisular, ofreciendo de este modo un sustrato para el crecimiento axonal.

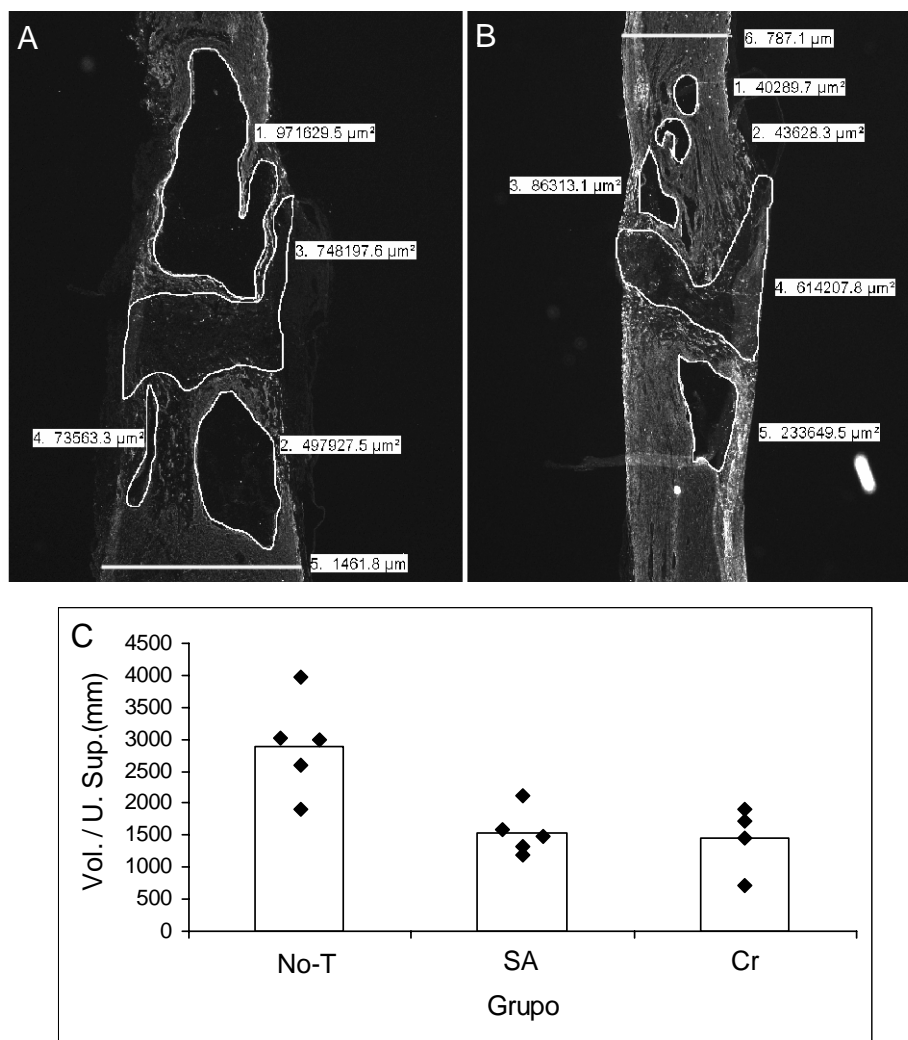
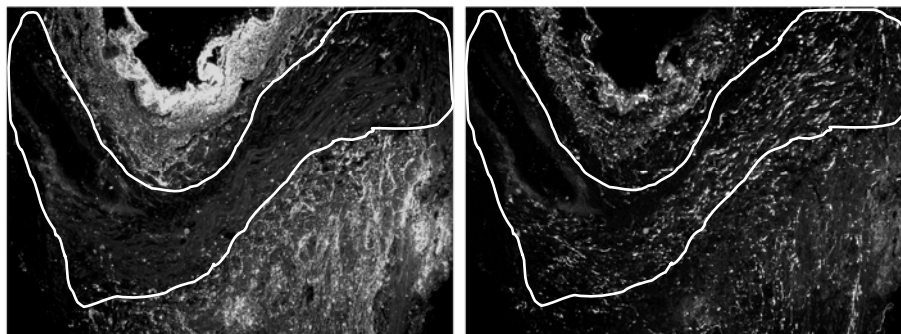


Figura 13. Microfotografías representativas de las medidas utilizadas como estimación del volumen de degeneración secundaria por unidad de superficie en un ejemplo de animal no trasplantado (A) y trasplantado (B). El segmento situado en la parte inferior de A y superior de B es la medida de la altura dorso-ventral de cada sección. Arriba: rostral; Abajo: caudal. (C) Histograma mostrando los volúmenes por unidad de superficie (mm) para cada animal (rombos negros) y las medias de esos volúmenes para cada grupo (columnas).

El análisis de regresión lineal mostró una correlación lineal negativa entre el volumen de tejido cicatricial junto con el de las cavidades y los niveles máximos de

recuperación funcional alcanzados por los animales en el test de la rampa inclinada ( $r = -0,861$ ;  $p < 0,001$ ), de modo que un menor volumen de degeneración, corresponde con una mayor recuperación funcional. Estos resultados sugieren que la menor degeneración secundaria promovida por los trasplantes de OEG podría facilitar la regeneración axonal gracias al mayor acercamiento entre los muñones, y con ello, la mayor recuperación funcional observada en los animales trasplantados (SA y Cr).

En la zona de la lesión también se observó la presencia de ramificaciones axonales positivas frente a neurofilamento distribuidas al azar, tanto en animales trasplantados como en animales control No-T. El resultado de la cuantificación de estos axones totales, medidos como píxeles marcados para neurofilamento en la cicatriz negativa (Fig. 14), utilizando el programa de análisis de imagen Metamorph, dio como resultado un porcentaje medio de píxeles de  $7,0 \pm 1,4$  para el grupo SA,  $8,5 \pm 0,5$  para el grupo Cr y  $5,8 \pm 0,9$  para los animales No-T. Aunque el número total de axones fue mayor en los animales trasplantados con OEG que en los animales control No-T, estas diferencias no fueron significativas ni para el grupo SA ni para Cr ( $p = 0,754$  para el grupo SA, y  $p = 0,086$  para Cr). Además tampoco hubo diferencias significativas entre los grupos SA y Cr ( $p = 0,462$ ). Se sabe que los axones lesionados, en su intento por encontrar sus dianas y volver a hacer contactos sinápticos con ellas se ramifican después de la lesión e invaden la zona de la cicatriz pero son incapaces de cruzarla y de crecer a lo largo del muñón caudal (Beattie *et al.*, 1997; Oudega *et al.*, 1999; Brook *et al.*, 2000; Joosten *et al.*, 2000). Estos brotes, tanto por parte de los axones lesionados presentes en el muñón rostral como en el caudal, provocan la presencia de un gran número de axones en la cicatriz, pero no significa que todos esos axones vayan a ser capaces de cruzar toda la cicatriz negativa y llegar al muñón opuesto. Esta es la razón por la que la presencia de un gran número de fibras positivas para neurofilamento en la zona de la lesión no significa necesariamente una mayor regeneración axonal y reconexión. Por este motivo, en este trabajo nos hemos centrado en poner a punto una técnica de trazado que nos permita distinguir entre las diferentes neuronas que regeneran su axón a través de la cicatriz glial y en el interior del muñón caudal y que son capaces de captar el trazador (ver apartado siguiente).



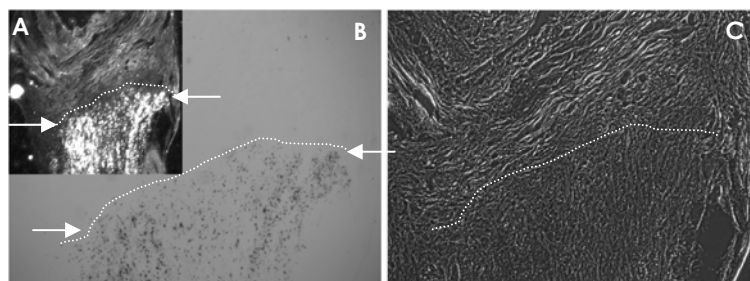
**Figura 14.** Secciones de la zona de la lesión en la médula espinal que muestran el aspecto de la tinción con GFAP (A) y con Neurofilamento (B) y el área de cicatriz GFAP negativa seleccionada para medir el porcentaje de píxeles iluminados.

### **I.3. Regeneración axonal de neuronas procedentes del tronco del encéfalo**

En todos los animales se inyectó la mezcla de HRP 25% y WGA-HRP 5% con la finalidad de trazar retrógradamente todas las neuronas supraespinales cuyos axones atravesaron la zona de la lesión y crecieron caudalmente. Nuestro propósito fue el de marcar el mayor número posible de haces en regeneración y ser capaces de distinguir entre los diferentes núcleos en regeneración en el tronco del encéfalo. Para poder identificar y cuantificar las neuronas en regeneración, mediante su localización en el tronco del encéfalo, trazamos todo el grosor de la médula espinal con un trazador que es captado por todos los tipos de axones. Esto fue necesario ya que no existen marcadores específicos para todos los tipos de fibras descendentes.

El trazador se inyectó a 0,5 cm desde el borde rostral del muñón caudal. En tres animales de cada grupo se supervisó la zona de la lesión para asegurarnos de que el trazador quedaba restringido al muñón caudal y no se producía difusión del trazador a través de la cicatriz (Fig. 15). No se observó difusión del trazador a través de la cicatriz caudal GFAP-positiva en ninguno de estos animales (Fig. 15). Por lo tanto, los axones de las neuronas marcadas con el trazador, tuvieron que ser capaces de atravesar la cicatriz rostral GFAP-positiva, la cicatriz GFAP-negativa, la cicatriz caudal GFAP-positiva, y de entrar en el muñón caudal para poder alcanzar y captar el trazador.





**Figura 15. Microfotografías mostrando la difusión del trazador desde la zona de inyección, mediante revelado con anti-WGA y DAB. Las tres microfotografías muestran la misma región del mismo tejido analizadas utilizando distintas técnicas microscópicas. A la izquierda se muestra la zona de la lesión en campo claro (B), y se observa cómo el trazador (los puntos negros) se detiene sin llegar a cruzar la cicatriz (flechas), que se distingue morfológicamente en la imagen de la derecha (C) con contraste de fases. A la izquierda se muestra el detalle de la misma zona con campo oscuro (A), donde se aprecia tanto el trazador (blanco) como la morfología de la cicatriz glial.**

Se contó el número de somas neuronales marcados retrógradamente en cinco núcleos del tronco del encéfalo relevantes para el inicio y la modulación de los patrones locomotores: formación reticular, locus coeruleus, núcleos rafe, vestibular y rojo. Todos estos núcleos analizados presentaron neuronas marcadas con WGA-HRP, y por tanto, neuronas que han regenerado sus axones a través de la lesión. La figura 16 muestra imágenes representativas de secciones de animales trasplantados y animales control no-trasplantados, en las que se observan neuronas marcadas en estos núcleos.

Aunque todos los animales sobrevivieron a las dos cirugías (la de lesión y la de trasplante), un animal Cr murió pocos días antes de la inyección del trazador (la tercera cirugía), por lo tanto, el número de animales trazados en el grupo Cr fue de cuatro.

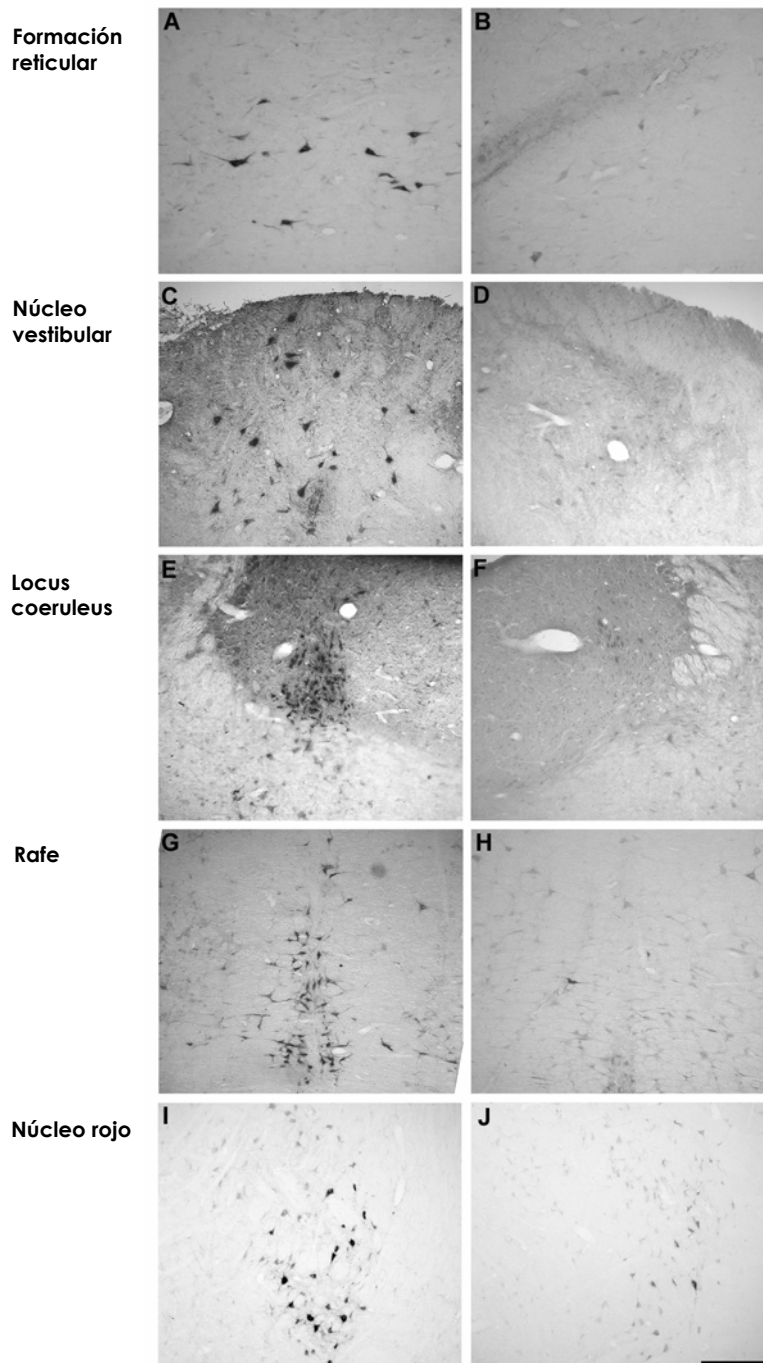
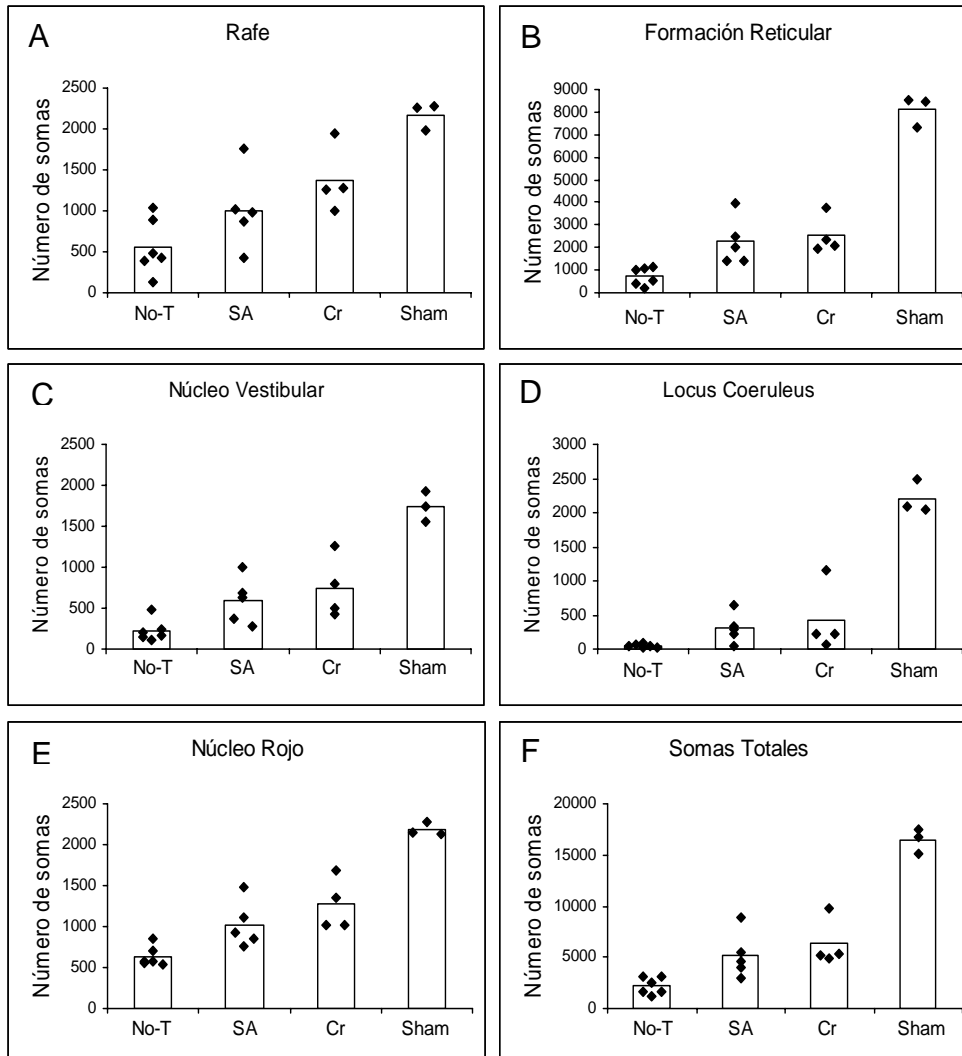


Figura 16. Secciones representativas en las que se muestra neuronas marcadas con HRP-WGA en los núcleos analizados en el tronco del encéfalo, en ratas trasplantadas (A, C, E, G, I) y no

**trasplantadas (B, D, F, H, J). (A, B) Formación reticular, (C, D) núcleo vestibular, (E, F) locus coeruleus, (G, H) rafe y (I, J) núcleo rojo. Se observó claramente un mayor número de neuronas marcadas en estos núcleos en los animales que recibieron trasplante de OEG. No se observó diferencias entre las secciones de animales trasplantados 1 ó 4 meses después de la lesión. Barra de escala (A-J) = 50  $\mu$ m.**

La regeneración axonal de las ratas SA y Cr fue significativamente superior que en los animales control ( $p < 0,033$ ) en casi todos los núcleos analizados, y lo mismo sucedió cuando se comparó el número total de neuronas contadas en el tronco del encéfalo ( $p < 0,018$ ) (Fig. 17). El único núcleo que no presentó diferencias significativas entre animales trasplantados y control No-T fue el rafe, y sólo en el grupo SA. En este caso, se observó una regeneración neuronal superior en los animales trasplantados, pero las diferencias no fueron significativas debido a la elevada variabilidad que presentaron los contajes. Los valores de significatividad para cada núcleo fueron: Rafe (SA:  $p = 0,201$ ; Cr  $p = 0,019$ ), formación reticular (SA:  $p = 0,006$ ; Cr:  $p = 0,011$ ), núcleo vestibular (SA:  $p = 0,018$ ; Cr:  $p = 0,019$ ), locus coeruleus (SA:  $p = 0,018$ ; Cr:  $p = 0,033$ ), núcleo rojo (SA:  $p = 0,018$ ; Cr:  $p = 0,011$ ).

Se utilizaron tres de los seis animales sham (sin lesión) para evaluar nuestra técnica de trazado y para cuantificar el número de neuronas que podían ser trazadas en condiciones normales. La media del número total de neuronas marcadas en los núcleos analizados del tronco del encéfalo utilizando esta técnica fue de  $16.399 \pm 609$  en los animales sham. Este valor fue de  $5.203 \pm 1.116$  en el grupo SA y  $6.330 \pm 1.176$  en Cr. En los dos grupos trasplantados, el número de neuronas contadas fue más del doble del número de neuronas contadas en los animales No-T ( $2.198 \pm 416$ ). La tabla 3 muestra el número de neuronas en regeneración por núcleo. En todos los núcleos la distribución entre el lado derecho y el izquierdo fue similar. Esta varió entre 50,7 y 54,1% en un lado frente a 49,3 y 45,9% en el otro lado en los diferentes núcleos, sin mostrar preferencia por ninguno de los dos lados.



**Figura 17.** Histogramas mostrando el número de neuronas marcadas con HRP-WGA en cada núcleo del tronco del encéfalo. (A-E) Cada panel muestra los contajes neuronales en cada núcleo analizado, comparando los grupos No-T, SA, Cr y Sham.

(F) Comparación entre los diferentes grupos, del número de neuronas totales en el tronco del encéfalo.

Los rombos negros muestran el número de neuronas en cada animal y las barras representan el número medio de neuronas por grupo. La regeneración axonal en las ratas SA y Cr fue significativamente superior que en las No-T ( $p < 0,05$ ) en cada uno de los núcleos analizados (excepto en el rafe del grupo SA) y también cuando se comparó el número total de neuronas

**contadas en el tronco del encéfalo. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los grupos SA y Cr en ningún caso.**

En todos los núcleos analizados, se observó un número de neuronas regeneradas ligeramente superior en el grupo Cr que en el grupo SA, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa. No existieron diferencias significativas entre el número de neuronas supraespinales regeneradas en los animales No-T a los que se les inyectó DMEM sin células uno o cuatro meses después de la lesión ( $p = 0,770$ ). En un trabajo previo ya se describió que no existían diferencias significativas entre el número de neuronas supraespinales que regeneraron su axón cuando se inyectó medio sin células inmediatamente o una semana después de la contusión en la médula espinal (Plant *et al.*, 2003). De acuerdo con estos resultados, y tal y como cabía esperar, nuestro método de inyección de medio de cultivo uno o cuatro meses después de la sección completa de la médula espinal no afectó a la regeneración espontánea de axones supraespinales descendentes.

Existe bastante variabilidad entre el número de neuronas marcadas dentro de los grupos, que podría ser consecuencia de variaciones individuales en los cambios patológicos y en el proceso de cicatrización en la zona de la lesión.

Para poder determinar el nivel de regeneración axonal en cada núcleo, calculamos el porcentaje de neuronas regeneradas asumiendo que el número de neuronas marcadas en los animales sham en cada núcleo corresponde con el 100% de neuronas que se pueden detectar con nuestra técnica. De acuerdo con esto, el número total de neuronas marcadas que hemos citado con anterioridad representa una regeneración de 38,6%, 31,7% y 13,4% en los grupos Cr, SA y No-T respectivamente. La tabla 3 muestra el porcentaje de neuronas regeneradas en cada núcleo. La regeneración más importante se observó en el rafe (63,4% en Cr; 46,6% en SA) y en el núcleo rojo (58,2% en Cr; 46,9% en SA), aunque estos fueron también los núcleos que presentaron mayor regeneración espontánea en las ratas control No-T (25,9% y 28,9%). Estos resultados suponen un aumento del doble de regeneración en los animales trasplantados respecto a los No-T. Sin embargo, la máxima diferencia entre los animales trasplantados y No-T la encontramos en el locus coeruleus, con una regeneración ocho veces superior en los animales

## Resultados

trasplantados con OEG (19% en Cr; 13.8% en SA, 2.4% en No-T), a pesar de que este núcleo fue el que menos regeneración presentó en todos los casos respecto al 100%. La formación reticular y el núcleo vestibular presentaron una regeneración del 30-40% que resultó ser tres veces superior a la del grupo No-T.

	Rafe		F. Reticular		N. Vestibular		L. Coeruleus		N. Rojo		TOTAL	
	somas	%	somas	%	somas	%	somas	%	somas	%	somas	%
Sham	2167 ± 81	100	8107 ± 338	100	1740 ± 94	100	2202 ± 120	100	2183 ± 40	100	16399 ± 609	100
SA	1009 ± 240	47	2273 ± 528	28	593 ± 143	34	303 ± 107	14	1025 ± 145	47	5203 ± 1116	32
Cr	1373 ± 200	63	2522 ± 430	31	746 ± 193	43	418 ± 249	19	1271 ± 161	58	6330 ± 1176	39
No-T	561 ± 171	26	730 ± 202	9	224 ± 69	13	53 ± 14	2	631 ± 61	29	2198 ± 416	14

**Tabla 3. Número de neuronas marcadas retrógradamente con HRP-WGA en los grupos Sham, SA, Cr y No-T. Los datos representan la media ± ESM. También se representa el porcentaje de neuronas marcadas en cada grupo tomando como 100% la media del número de neuronas en el grupo sham.**

También analizamos la presencia de neuronas marcadas en la corteza motora para poder cuantificar la regeneración axonal del haz corticoespinal. En este caso, sólo un pequeño número de axones fueron capaces de cruzar la cicatriz y de captar el trazador (aproximadamente un 6% del total de somas contados en los animales sham para todos los grupos) y esta discreta regeneración fue la misma en animales trasplantados y en animales control no trasplantados, sin mostrar diferencias significativas en ningún caso ( $p < 1$  en el caso del grupo SA y  $p = 0,519$  para el grupo Cr). Según estos resultados, la OEG no parece promover la regeneración del haz corticoespinal cuando es trasplantada en la fase subaguda y crónica de la lesión.

Con los resultados obtenidos podemos concluir que la inyección de OEG uno o cuatro meses después de la lesión constituye una técnica efectiva para promover la regeneración axonal, y que las neuronas del tronco del encéfalo conservan la capacidad para regenerar sus axones durante al menos cuatro meses después de la sección completa de la médula espinal a nivel torácico 8. Además,

el grado de regeneración obtenido es el mismo cuando se trasplanta OEG en las fases subaguda y crónica de la lesión.

El número de neuronas regeneradas correlaciona con la recuperación funcional de las ratas y con el volumen de degeneración secundaria

El análisis de la regresión lineal indicó que el número de neuronas marcadas en el tronco del encéfalo es mayor en aquellas ratas que presentaron una mejor evolución en el test de la rampa inclinada. El nivel máximo alcanzado por todas las ratas mostró una correlación positiva con el número total de neuronas contadas en el tronco del encéfalo ( $r = 0,733$ ;  $p < 0,001$ ) y también con el número de somas en todos los núcleos analizados de forma independiente ( $r = 0,784 - 0,641$ ;  $p < 0,008$ ). Para poder estimar la progresión temporal de la recuperación funcional en cada rata, se asignó una puntuación a cada animal. Esta puntuación se obtuvo sumando del nivel alcanzado cada mes durante el periodo de los ocho meses que duró la recuperación. Como se ha mencionado anteriormente, después de este periodo no se observaron cambios funcionales en ningún animal. El valor final obtenido para cada rata correlacionó tanto con el número total de somas neuronales contados ( $r = 0,897$ ;  $p < 0,001$ ) como con el número de somas en cada núcleo ( $r = 0,899 - 0,847$ ;  $p < 0,001$ ).

Por otro lado, el número total de neuronas marcadas en el tronco del encéfalo presentó una correlación lineal negativa con el volumen de degeneración tisular medido en la zona de la lesión ( $r = -0,870$ ;  $p < 0,001$ ), y lo mismo sucedió cuando se analizó la regresión lineal teniendo en cuenta el número de neuronas por cada núcleo ( $r = 0,888 - 0,807$ ;  $p < 0,001$ ).

En general, todos estos resultados indican que los trasplantes de OEG promueven una mayor preservación del tejido en la zona de la lesión, lo cual facilita la regeneración de axones a su través y estos axones parecen estar implicados en la recuperación funcional observada en los animales trasplantados, como indica la correlación lineal existente entre el número de neuronas y la recuperación funcional.

## II. EFECTOS DE LA FIJACIÓN DE LA COLUMNA VERTEBRAL EN LA REPARACIÓN MEDULAR DE LOS ANIMALES DE ESTE ESTUDIO

### II.1. Estudio de la inocuidad y firmeza del método utilizado para estabilizar la columna vertebral

Cualquier lesión (mecánica, tóxica, irritativa u otras) en la médula espinal, produce una respuesta reactiva tanto de la microglía como de los astrocitos. La inocuidad de los puentes de resina se analizó mediante inmunohistoquímica para detectar astrogliosis, microgliosis y migración de macrófagos en la médula espinal por debajo de los puentes.

El periodo de supervivencia seleccionado para este análisis fue de dos semanas, siendo este un periodo apropiado puesto que la reacción inflamatoria es un fenómeno que ocurre de forma rápida. Los macrófagos invaden rápidamente la lesión y permanecen en esta zona en gran número desde cuatro días hasta siete semanas (Frisen *et al.*, 1994). Además, la gliosis reactiva aparece inmediatamente después de la lesión y alcanza su pico máximo tras dos semanas (Nieto-Sampedro *et al.*, 1988). Hemos utilizado el anticuerpo ED1 (anti-CD68) que reconoce tanto los macrófagos como la microglía reactiva. Además, utilizamos el anticuerpo frente a GFAP para detectar los astrocitos reactivos.

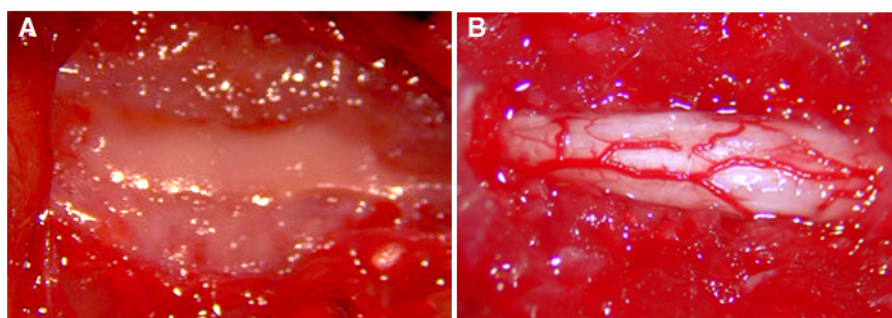
Después de analizar 9 animales sham, dos semanas después de la laminectomía, observamos que el agujero creado entre las vértebras T6 y T10 permaneció cubierto por los puentes de resina. En todos estos animales los puentes de cemento estaban firmemente sellados a los procesos espinales y las láminas de las vértebras adyacentes intactas. Esto indica que el puente no se movió de su posición inicial y mantuvo las dos vértebras firmemente alineadas. Además las médulas se mantuvieron en buen estado debajo de los puentes, de modo que no fueron comprimidas por ellos ni por tejidos circundantes tal y como muestran los resultados macroscópicos y microscópicos.

#### *Observaciones macroscópicas*

En todos los animales se formó una fina capa de tejido conjuntivo encima de los puentes, y una densa capa por debajo, justo encima de la médula espinal. Esta última, no se mostró firmemente adherida a la médula espinal, permitiendo su



re-exposición y la posibilidad de acceder a ella si se quiere aplicar algún tratamiento en posibles situaciones crónicas, y permitiendo colocar un nuevo puente de cemento en caso de ser necesario. La resina no causó ninguna reacción inflamatoria visible macroscópicamente, ni en la médula espinal ni en los tejidos circundantes (Fig. 18).



**Figura 18. (A) Capa densa de tejido conjuntivo formado inmediatamente debajo del puente de cemento, cubriendo la médula espinal. (B) Médula espinal intacta tras retirar el cemento y la capa de tejido conjuntivo. Ambas fotos tomadas dos semanas después de la laminectomía y de la colocación del cemento. Derecha: Rostral; Izquierda: Caudal.**

### *Observaciones microscópicas*

No se detectó ningún signo inmunohistoquímico ni de gliosis reactiva ni de invasión de macrófagos en ninguna de las secciones marcadas con anticuerpos frente a ED1 ni frente a GFAP de la zona de la médula por debajo del puente de cemento (Fig. 19). Esto indica que el puente de resina no produjo ninguna respuesta inflamatoria en la médula espinal en contacto con él.

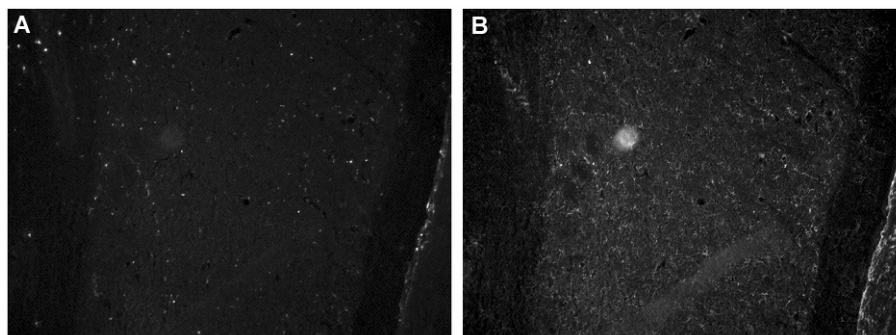
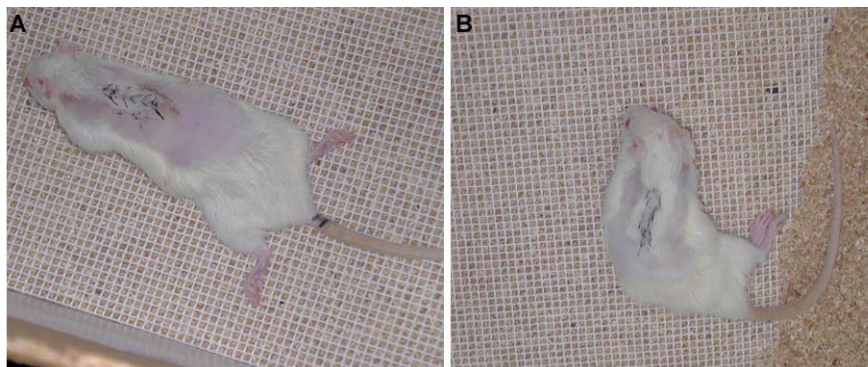


Figura 19. Microfotografías representativas mostrando la ausencia de marcaje para ED1 (CD68) (A) y para GFAP (B) en una sección de la médula espinal por debajo del puente de cemento, en ratas sin lesión medular, que fueron perfundidas dos semanas después de la laminectomía. Arriba: rostral; Abajo: caudal.

## II.2. Efecto promovido por la estabilización de la columna sobre el desarrollo de escoliosis

Tal y como se ha demostrado en trabajos previos, el tono muscular equilibrado controlado por los reflejos posturales es muy importante para mantener la postura normal con la médula espinal recta y, la ruptura de ese equilibrio puede inducir el desarrollo de escoliosis (Machida *et al.*, 2005). Por otro lado, la inestabilidad rotacional de la columna vertebral como resultado de un daño medular también puede inducir deformidad escoliótica característica como fenómeno secundario (Barrios *et al.*, 1987).

En estudios previos en nuestro laboratorio, el desarrollo de deformaciones vertebrales como la escoliosis ha sido un problema habitual en animales con lesión completa en la médula espinal. El 82,6% de nuestras ratas con lesión medular completa y a las que no se les estabilizó la columna vertebral desarrollaron una curva escoliótica, mientras que sólo en el 42,42% de las ratas a las que se les fijó la columna vertebral con puentes de cemento dental sufrieron tales alteraciones (Fig. 20). Aparentemente, podemos concluir que los puentes de cemento disminuyen la inestabilidad de la columna vertebral tras la laminectomía y aumentan la probabilidad de mantener una postura normal disminuyendo la rotación de la médula espinal y probablemente, facilitando una mejor regeneración axonal.



**Figura 20. (A) Rata con sección medular completa cuya columna vertebral fue fijada con un puente de cemento. (B) Rata con sección medular completa sin fijación de su columna vertebral. Nótese la colocación lateralizada de sus patas traseras debido a la orientación de su columna vertebral.**

### **II.3. Recuperación funcional espontánea de animales parapléjicos promovida por la fijación de la columna vertebral**

También hemos querido averiguar si la fijación de la columna vertebral mediante puentes de cemento en animales con lesión completa, podría tener algún efecto sobre la recuperación funcional. Para ello hemos utilizado animales con sección completa en su médula espinal, en los que no se aplicó ninguna terapia regeneradora. Hemos comparado el nivel de recuperación funcional alcanzado por animales control no trasplantados provenientes de un estudio previo, en los que no se fijó la columna vertebral, (Ramon-Cueto *et al.*, 2000), y que sufrieron el mismo tipo de lesión medular ( $n = 12$ ), con los animales del grupo No-T del presente estudio, en los que se colocó puentes de cemento para fijar la columna vertebral ( $n = 6$ ). En todos estos animales la recuperación funcional se evaluó semanalmente utilizando el test de la rampa inclinada. Durante los cuatro primeros meses no se observaron diferencias entre ambos grupos. Como se ha descrito anteriormente, el grupo No-T presentó cierto grado de recuperación espontánea que empezó en el segundo mes y evolucionó hasta el sexto mes post-lesión, momento en el que dicha recuperación se detuvo. El análisis estadístico de los resultados mostró una mayor recuperación funcional en los animales control a los que se les fijó la columna vertebral después de la lesión ( $p < 0,001$ ), pero estas

diferencias sólo fueron significativas a partir del mes quinto ( $p = 0,039$ ). Mientras que ninguno de los animales del estudio previo fue capaz de superar ni el mínimo nivel de dificultad del test de la rampa inclinada, al final del periodo de estudio una de las seis ratas a las que se les fijó la columna superó el nivel 3 y otras dos ratas superaron el nivel 1. Según estos resultados, la fijación de la columna vertebral parece promover cierto grado de recuperación funcional y de regeneración espontánea, que podría ser debido a un mayor acercamiento de los muñones medulares, y que promovió una mayor recuperación funcional en animales que no recibieron ningún otro tratamiento promotor de la regeneración. Sin embargo, esta recuperación funcional fue muy superior cuando se trasplantó OEG en las médulas lesionadas, como se demuestra con las grandes diferencias significativas observadas entre los animales trasplantados y los No-T del presente estudio, en los que se colocó puentes de cemento fijando la columna vertebral.

### **III. CARACTERIZACIÓN DE LA OEG PROCEDENTE DE BULBOS OLFATORIOS DE PRIMATES ADULTOS EN COMPARACIÓN CON LA OEG DE ROEDORES PARA SU POSIBLE USO EN TERAPIA**

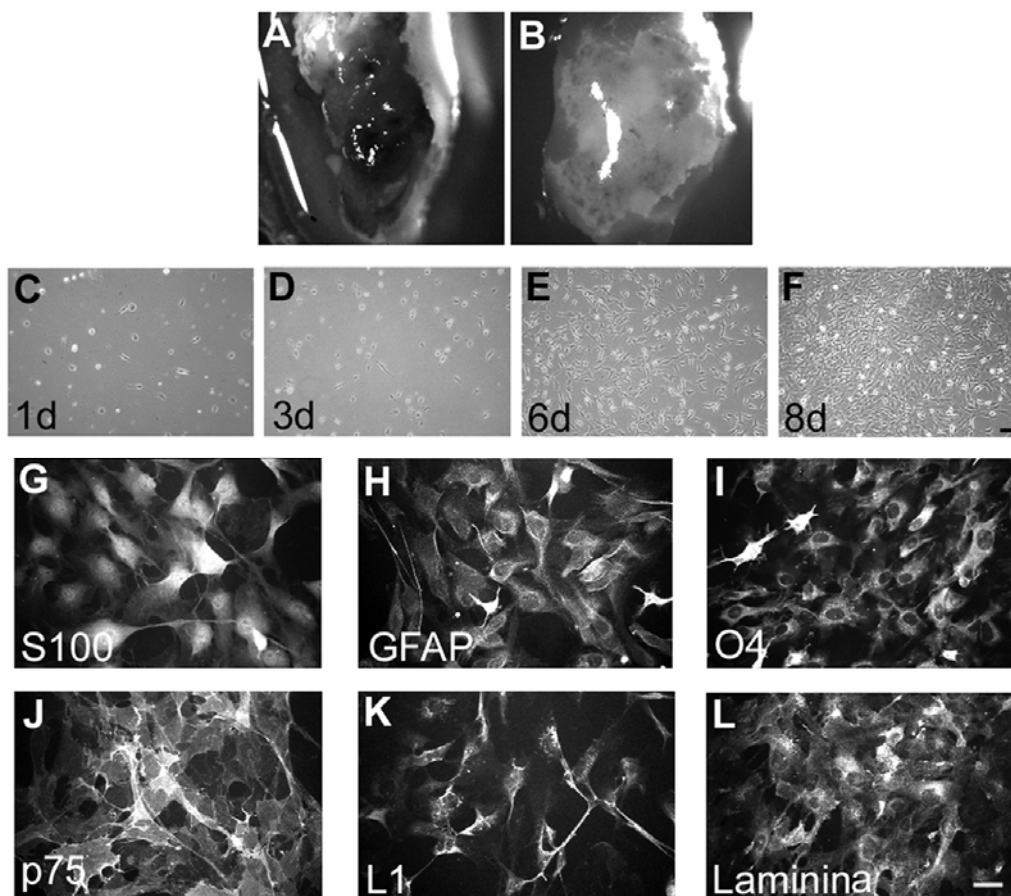
El objetivo último de las investigaciones que se están desarrollando con OEG en roedores es su aplicación clínica en personas. Sin embargo, el primer paso antes de plantearse una posible aplicación clínica de estas células en terapia es conocer si se pueden obtener a partir de bulbos olfatorios (BO) de primates adultos y su idoneidad para ser aplicadas en clínica. Con este fin hemos sembrado células procedentes de BO de monos macacos para analizar si de esta estructura de primates se puede obtener OEG y, de ser así, estudiar sus propiedades desde el momento de la siembra hasta pasados periodos largos en cultivo. Con ello pretendemos establecer en qué fases del cultivo la OEG presenta un fenotipo óptimo para ser utilizada en terapia y con garantías de seguridad.

Como podrían existir diferencias entre las células obtenidas de BO de roedor y las de primate, y puesto que el roedor sigue siendo el modelo animal utilizado por la mayoría de los investigadores, hemos realizado en paralelo la caracterización de cultivos de OEG de mono y de rata para así poder establecer

similitudes y diferencias de este tipo celular entre las especies. En el caso de OEG de rata, esto además permitirá profundizar y proporcionar información, ahora mismo no existente, sobre qué tipo de cultivo y cuándo los cultivos de OEG de rata pueden utilizarse tanto en experimentos de trasplante como en otros con la garantía de que siguen presentando su fenotipo original y de que no han sufrido modificaciones.

### **III.1. Propiedades de cultivos de OEG procedente de bulbos olfatorios de primates adultos**

En nuestro laboratorio se ha puesto a punto el método para cultivar OEG a partir de las capas del nervio olfatorio y glomerular (ONGL) de bulbos olfatorios de monos macacos adultos (*Nemestrina* y *Mulatta*). Las células sembradas a partir de ONGL se pegaron a los frascos de cultivo tras cinco horas y permanecieron redondas y pequeñas durante los dos primeros días *in vitro* (Fig. 21 C). Después del segundo día, empezaron a extender prolongaciones adquiriendo una morfología bipolar o multipolar similar a la que presenta la OEG de roedor tras el mismo tiempo en cultivo, aunque las prolongaciones fueron un poco más cortas (Fig. 21 D, E) (Ramon-Cueto y Nieto-Sampedro, 1992; Ramon-Cueto y Avila, 1998). Se observaron algunas células de microglía típicas en los mismos cultivos. Las células procedentes de ONGL se dividieron y alcanzaron la confluencia tras ocho días en cultivo (Fig. 21 F). Tras este periodo los cultivos quedaron libres de células microgliales ya que estas se despegaron cuando dichos cultivos alcanzaron la confluencia. Los sub-cultivos alcanzaron de nuevo la confluencia 3 días después del pase, y las células mostraron una morfología ligeramente más aplanada (Fig. 21 G). Al igual que en los roedores, todas las células de ONGL de primate expresaron S100, Proteína ácida de los Filamentos Gliales (GFAP), O4, L1, laminina (Fig. 21) y no expresaron NG2 ni colágeno IV (no se muestra). Además, el noventa por cien de las células en los cultivos expresó el receptor de baja afinidad del factor de crecimiento nervioso, p75 (Fig. 21 J). Por lo tanto, las células obtenidas a partir de los bulbos olfatorios de monos adultos son OEG ya que muestran las propiedades típicas de estas células (Ramon-Cueto y Avila, 1998).



**Figura 21.** Cultivos primarios de OEG extraídos de las capas glomerular y del nervio olfatorio (ONGL) de bulbos olfatorios de primates durante los primeros ocho días en cultivo. (A) Bulbo olfatorio de un mono *macaca mulatta*. (B) ONGL disecadas a partir del BO de la foto A. (C-F) Aspecto de los cultivos primarios de ONGL de macaco a diferentes tiempos post sembrado, d: días en cultivo. (G-L) Propiedades inmunocitoquímicas de los cultivos primarios de ONGL (de la OEG) tras una semana de la siembra. Estas células expresan S100 (G), GFAP (H), O4 (I), p75 (J), L1 (K) y laminina (L). Las barras de escala representan 50μm.

Una diferencia importante entre los cultivos primarios de roedor y de primate fue la mayor proporción de OEG p75 positiva en los cultivos de mono. Mientras que los cultivos primarios de BO de roedor presentaron sólo un 35% de OEG inmunoreactiva para p75 (Ramon-Cueto y Nieto-Sampedro, 1992), la mayoría de las células en los cultivos de bulbo olfatorio de mono presentaron esta molécula en

sus membranas (Fig. 21 y 24). Esta es una ventaja que presentan los cultivos de mono respecto a los de rata ya que, en los primeros, no parece necesaria la purificación de la OEG-p75, que es el tipo de OEG que utilizamos en todos nuestros experimentos. De acuerdo con este resultado, en los siguientes estudios que implican la utilización de OEG de mono hemos eliminado el paso de la purificación de la metodología.

### **III.2. Estudio de la vida media de la OEG de roedor y de primate adultos en cultivo**

Hemos comparado la tasa de crecimiento de la OEG de primate y de roedor utilizando, de las dos especies, cultivos que contenían más del 90% de OEG-p75. En monos, los cultivos primarios alcanzaron esta proporción de células sin realizar ningún proceso de purificación. Sin embargo, para obtener un porcentaje similar de OEG que expresase p75 en los cultivos de rata, estas células tuvieron que ser seleccionadas de los cultivos primarios mediante inmunopanning (ver explicación en material y métodos).

Los cultivos de OEG de macaco empezaron dividiéndose a una tasa de 3 Duplicaciones Poblacionales por semana (DPs/semana), después esta tasa disminuyó, pero continuaron dividiéndose a una tasa mayor de 2 DPs/semana durante las primeras cinco semanas *in vitro* (Fig. 22A).

Después del segundo mes, los cultivos empezaron a dividirse menos de 1 DP/semana y continuaron con esta tasa hasta la semana 15, momento en el que se habían dividido un total de  $16,39 \pm 0,30$  DPs (media  $\pm$  ESM) (Fig. 22 B). En este punto las células prácticamente dejaron de dividirse y no reanudaron esta actividad en todo el periodo de estudio (Fig. 22 A). Atendiendo a la tasa de división, se considera que un cultivo se encuentra en estado presenescente cuando se divide menos de una vez por semana y senescente cuando se divide menos de una vez en dos semanas (Bodnar *et al.*, 1998). Siguiendo este criterio, la OEG de mono entró en estado presenescente tras el segundo mes *in vitro* entrando en senescencia un mes y medio más tarde. Como excepción, uno de los cultivos creció a una tasa ligeramente superior por un total de 4 meses (experimentando un total de 19 DPs en ese tiempo), punto en el que fue congelado.

Por lo tanto, a partir de un bulbo olfatorio de macaco, y sembrando 500.000 células, se puede obtener en dos meses y medio, al menos  $2,5 \times 10^{10}$  OEG no

senescente. Los cultivos crecidos en presencia o ausencia de forskolina y extracto de pituitaria presentaron la misma actividad mitótica indicando que el suero es suficiente para el crecimiento de la OEG y que no se requieren factores adicionales.

En comparación, la OEG de roedor presentó una tasa de crecimiento muy diferente, dividiéndose muy despacio inmediatamente después de la siembra y presentando una vida media muy corta. Estas células empezaron dividiéndose a una tasa de 1 DP/semana, y la mantuvieron durante las primeras 5 semanas *in vitro* (Fig. 22 A). De acuerdo a los criterios establecidos (Bodnar *et al.*, 1998) se considera que un cultivo con estas DPs/semana se encuentra en estado presenescente. Pasado este periodo, la tasa disminuyó hasta un estado prácticamente de no-división (0,5 DP/semana), mostrando un total de  $4,25 \pm 0,30$  DPs (media  $\pm$  ESM) tras siete semanas (Fig. 22 B). Esta tasa tan baja de proliferación se mantuvo durante un mes más, presentando diferencias significativas con la división a tiempos tempranos ( $p = 0,01$ ). Cuando los cultivos se crecieron con medio sin forskolina ni extracto de pituitaria se produjo un dramático descenso en la tasa de división de los cultivos de OEG de rata, desarrollando, como máximo, un total de 1,29 DPs en 10 semanas *in vitro*. Esto indica que la adición de mitógenos es necesaria para mantener la división celular de la OEG de roedor.

En conclusión, los cultivos de OEG de roedor se encuentran en estado presenescente inmediatamente tras el sembrado y se convierten en senescentes tras 5 semanas en cultivo. Por lo tanto, sembrando 500.000 células podríamos obtener tan solo  $4,5 \times 10^6$  células en estado presenescente tras siete semanas *in vitro*.

Si una vez en estado senescente, se prolonga el tiempo en cultivo de estas células durante un mes más (tras 2,5 meses), estas reanudan su división mostrando un aumento lento pero progresivo en la tasa de proliferación. Esto es un signo de immortalización espontánea (Sonigra *et al.*, 1996). Dos semanas más tarde estas células alcanzaron 1,5 DPs/semana (estadísticamente distinto a lo descrito previamente,  $p = 0,01$ ) y las mantuvieron durante todo el periodo de estudio (Fig. 22 A).



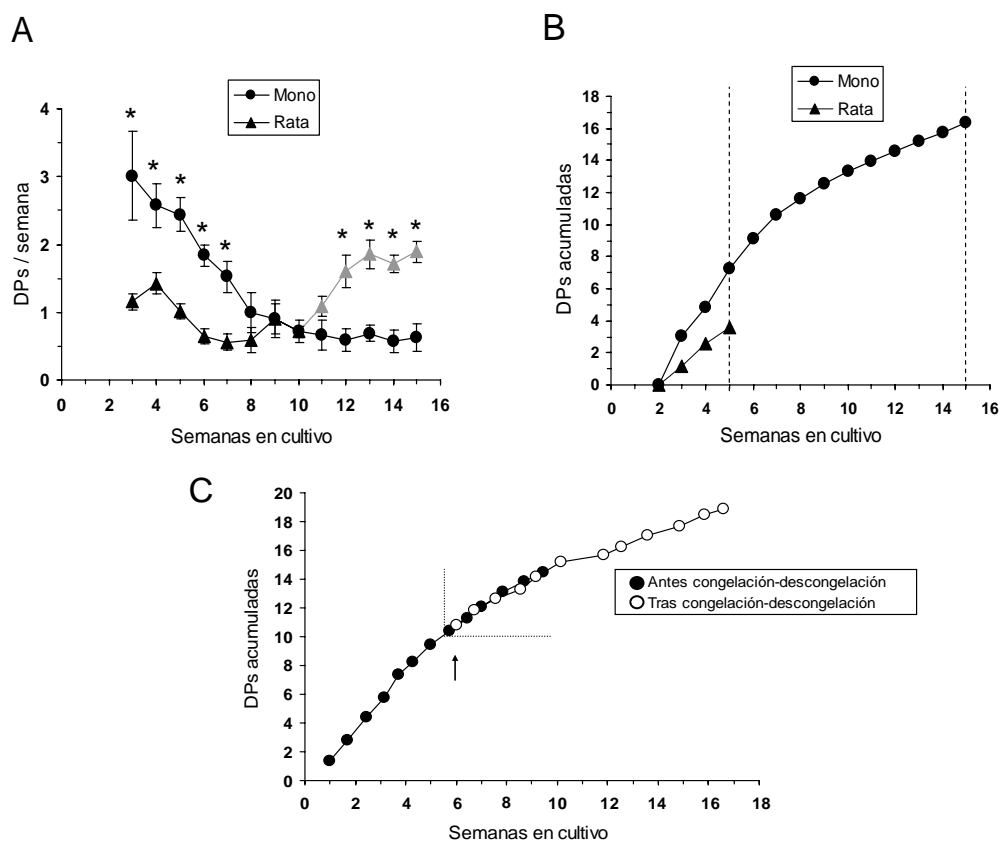


Figura 22. Comparación de la evolución temporal de la tasa de crecimiento de la OEG de rata y de primate adultos en cultivo. (A) Gráfica que muestra las duplicaciones poblacionales por semana (media  $\pm$  ESM) de cultivos de OEG de 6 ratas (triángulos) y 4 macacos (círculos). Los triángulos grises representan las DP/s/semana de la OEG de rata inmortalizada espontáneamente. \*Diferencias significativas entre los cultivos de OEG de mono y de rata (valores de p entre 0,01 y 0,029). (B) Suma de los valores medios de DP/s/semana representados en el panel A, para mostrar las DP acumuladas por semana y el número total de divisiones que estos cultivos experimentaron antes de su entrada en senescencia (línea discontinua). (C) Los cultivos de OEG de mono mostraron la misma tasa de crecimiento antes de su congelación (círculos negros) y después de la descongelación (círculos blancos). Nótese el solapamiento entre las dos curvas de crecimiento (flecha/línea discontinua).

En conclusión, los cultivos a largo plazo de OEG de roedor y de primate mostraron diferencias estadísticamente significativas en su tasa de proliferación *in vitro*. Esta tasa fue significativamente superior en los cultivos de mono ( $p < 0,001$ ), con más de 2 DPs/semana durante las primeras cinco semanas. Además, los cultivos de OEG de roedor fueron presenescentes inmediatamente tras su siembra, mientras que los de OEG de mono fueron no-senescentes, y se convirtieron en presenescentes tras más de dos meses en cultivo. De hecho, sólo los cultivos de OEG de primate mayores de 9 semanas, que son presenescentes, mostraron una tasa de división similar a la de los cultivos de corto plazo de rata (menos de 1PD/semana). A diferencia de los cultivos de roedor, los de primate no reanudaron su división tras entrar en senescencia y por lo tanto, esto sugiere que no se inmortalizaron espontáneamente durante el periodo estudiado *in vitro*.

Además la tasa de división de la OEG de primate fue independiente de la adición de mitógenos al medio de cultivo, lo que también las diferencia de la OEG de roedor. Por lo tanto, estos mitógenos no son responsables ni necesarios para la división de estas células, siendo suficiente el suero para mantener su tasa de crecimiento. Todos estos resultados en su conjunto, parecen garantizar la posibilidad de una terapia autóloga, puesto que la OEG se puede obtener a partir de un solo bulbo olfatorio de un paciente y puede ser crecida en su propio suero. Además la OEG se puede almacenar congelada ya que el proceso de congelación y descongelación no afecta a la capacidad de crecimiento de la OEG de mono (Fig. 22 C) ni de rata.

Tanto en los cultivos de OEG de rata como en los de mono se comprobó que el número de células muertas presentes en el medio de cultivo no afectaba a los valores de las DPs.

### **III.3. Cambios fenotípicos de la OEG de roedor y de primate adultos tras periodos largos en cultivo**

#### *III.3.1. Cambios morfológicos*

Los cultivos iniciales de OEG de primate mostraron una morfología similar a los de rata, pero con procesos un poco más cortos (Fig. 22 E y F). Durante los dos primeros meses *in vitro* la OEG de macaco mantuvo una apariencia similar

(comparar Fig. 23 A,B con Fig. 23 E). Sólo algunas células mostraron un citoplasma ligeramente más extendido (Fig. 23 B). Tres semanas después, ambos tipos celulares (las pequeñas células con prolongaciones finas y las células aplanadas casi sin prolongaciones) empezaron a aparecer aproximadamente al 50% en los cultivos (Fig. 23 C). No fue hasta el cuarto mes cuando las células aplanadas resultaron ser la mayoría en los cultivos de OEG de primate (Fig. 23 D). Desde entonces se mantuvo esta morfología y nunca observamos focos de transformación o ningún signo de pérdida de inhibición por contacto. Además, cabe destacar que la OEG de mono nunca alcanzó tamaños tan grandes como los observados en la OEG de roedor (Comparar Fig. 23 D con 23 G y ver más abajo).

La OEG de rata, a diferencia de la de mono, sufrió cambios morfológicos asociados a senescencia a corto plazo *in vitro*. Durante las dos primeras semanas después de la purificación (tres semanas en cultivo) las células de rata mostraron la morfología típica de la OEG que ha sido descrita en otros trabajos, revisado en (Ramon-Cueto y Valverde, 1995). Brevemente, las células mostraron formas estrelladas o bipolares, distinguiéndose por sus largas y finas prolongaciones, similar a la morfología de la OEG de mono (Fig. 23 E). Sin embargo, muy pronto en cultivo, entre la tercera y cuarta semana, la OEG de roedor empezó a cambiar progresivamente su apariencia, perdiendo sus prolongaciones, que desaparecieron prácticamente tras 4 semanas *in vitro*. Durante este proceso, su citoplasma fue aumentando de tamaño y el núcleo y nucleolo se tornaron más evidentes, confiriéndole a la OEG una morfología más aplanada (Fig. 23 F).

A partir de la cuarta semana, y durante un mes más, la OEG conservó esta morfología senescente, aumentando incluso su tamaño considerablemente (Fig. 23 G). En estas células aplanadas los filamentos intermedios (GFAP positivos) fueron más abundantes y organizados en bandas. Además se observó con cierta frecuencia células de rata con más de un núcleo. Todas estas características morfológicas son típicas de células senescentes tal y como han descrito otros autores (Benn, 1976; Angello *et al.*, 1989). De acuerdo con esto, podemos concluir que la OEG de roedor envejeció pronto en cultivo, mostrando un fenotipo típico senescente tras la tercera semana *in vitro*.

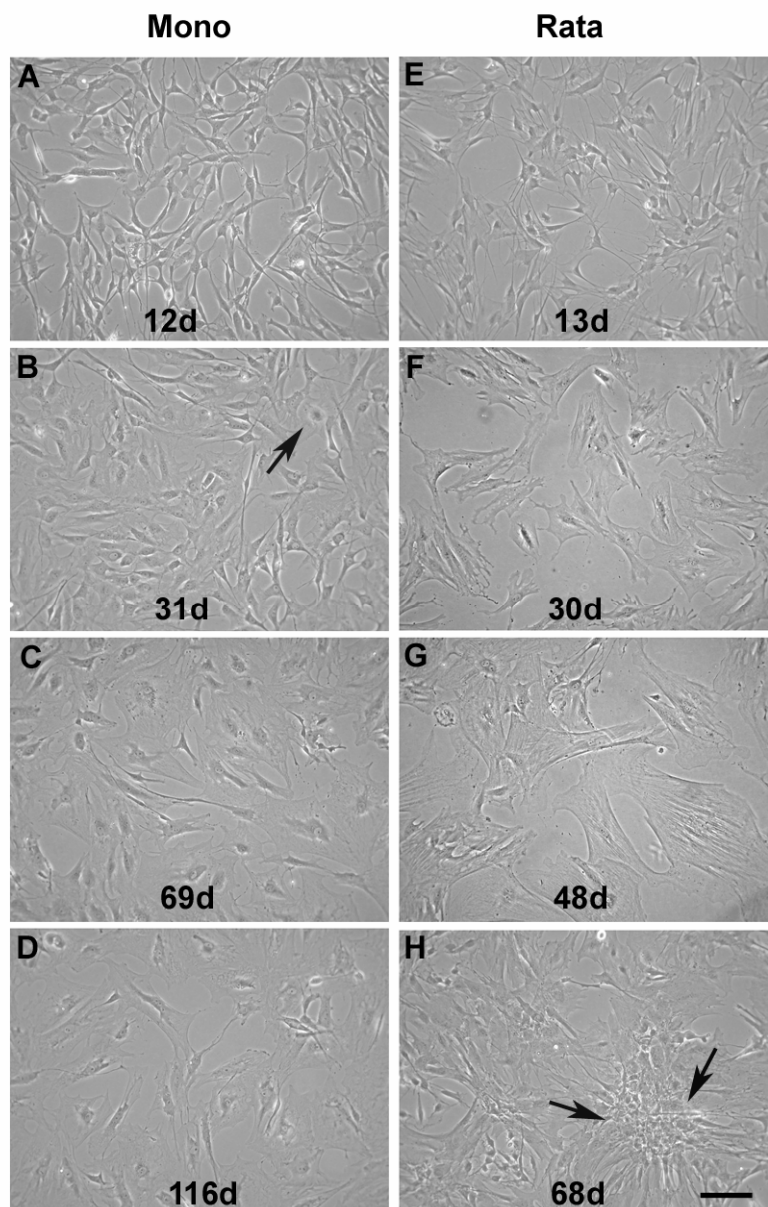


Figura 23. Morfología de la OEG de primate y roedor adultos a diferentes tiempos en cultivo. (A-D) Cultivos de OEG de mono y (E-H) de rata. Morfología de la OEG de macaco antes (A, B) y después (C, D) del segundo mes *in vitro*. La flecha en B señala una célula ligeramente aplanada. La morfología de la OEG de rata en cultivos de corto plazo (E) cambió de la tercera semana en adelante (F, G), y las células se tornaron grandes y aplanadas. (H) Formación de

**focos en los cultivos de OEG de rata tras su entrada en senescencia (flechas). R, Rata; M, Mono; d, días en cultivo. Barra de escala en (E-G)=50  $\mu$ m, y en (A-D, H)=100  $\mu$ m.**

Cuando mantuvimos las células en cultivo un mes más después de su entrada en senescencia (dos meses *in vitro*), empezaron a experimentar nuevos cambios morfológicos. Estas disminuyeron su tamaño y algunas incluso desarrollaron una o dos prolongaciones finas, adquiriendo una forma alargada y fusiforme. Estos cambios en la morfología coincidieron con el punto temporal en el que las células empezaron a dividirse de nuevo (ver apartado anterior). En estos cultivos las células se dividieron repetidamente hasta formar focos, sugiriendo una pérdida de inhibición por contacto posiblemente asociada a la transformación de las células (Fig. 23 H y 24 G, H).

Tanto en los cultivos de OEG de roedor como en los de primate, los cambios morfológicos descritos no se vieron alterados tras la retirada de forskolina y PEX del medio de cultivo, sugiriendo que dichos cambios morfológicos son independientes de la actividad mitótica de las células.

### *III.3.2. Propiedades inmunocitoquímicas de la OEG de primate y de roedor*

Durante todo el periodo analizado, los cultivos de OEG de mono mantuvieron la expresión de p75, S100, GFAP, O4, laminina y L1 del mismo modo que los cultivos a corto plazo (Fig. 24 A - D). El número de células p75 positivas fue superior al 90% incluso en el último periodo *in vitro* (más de 4 meses), sin mostrar diferencias significativas con respecto a los primeros tiempos inmediatamente después de la siembra (Fig. 24 I). La única diferencia entre los cultivos de mono a corto y a largo plazo fue una disminución en la intensidad de p75 y S100 tras la segunda y tercera semana respectivamente. Tras dos semanas, sólo el 40% de las células fueron intensamente inmunoreactivas para p75, y sólo un 10% continuaron siéndolo al final del segundo mes. Como excepción a lo mencionado, uno de los cultivos conservó más del 90% de sus células intensamente marcadas para p75 incluso después de cuatro meses y medio *in vitro*. A partir de la tercera semana se produjo un dramático descenso en la intensidad del marcaje para S100 en el 90% de las células, pero la expresión, aunque menos intensa, se mantuvo durante todo el periodo en cultivo.

## Resultados

---

En comparación, los cultivos de OEG-p75 de roedor experimentaron un dramático descenso altamente significativo ( $p < 0,001$ ) en el número de células p75 positivas tras la tercera semana *in vitro* (Fig. 24 G, I), y este receptor desapareció en casi todas las células tres semanas después (Fig. 24 I). La expresión de otras moléculas como GFAP (Fig. 24 E) y O4 (Fig. 24 H) se mantuvo durante todo el periodo en cultivo. Sin embargo, se produjo una disminución progresiva en la intensidad de S100 en todos los cultivos, con más del 50% de las células marcadas débilmente tras 4-5 semanas en cultivo (el resto de las células continuó mostrando marcaje intenso (Fig. 24 F). Tras ocho semanas en cultivo sólo un 10% de las células continuó presentando tinción intensa para S100 y continuó siendo así durante el resto del periodo de estudio. Las propiedades inmunocitoquímicas de rata y de mono no se vieron afectadas por el proceso de congelación-descongelación.

En conclusión, la OEG de primate y de roedor mostraron comportamientos muy diferentes en cultivo. Mientras que la OEG de mono conservó su morfología e inmunocitoquímica tras largos periodos en cultivo (2,5 meses) sin mostrar apariencia senescente, la de rata mostró cambios fenotípicos pronto en cultivo (tras tres semanas) y presentó propiedades típicas de células senescentes.

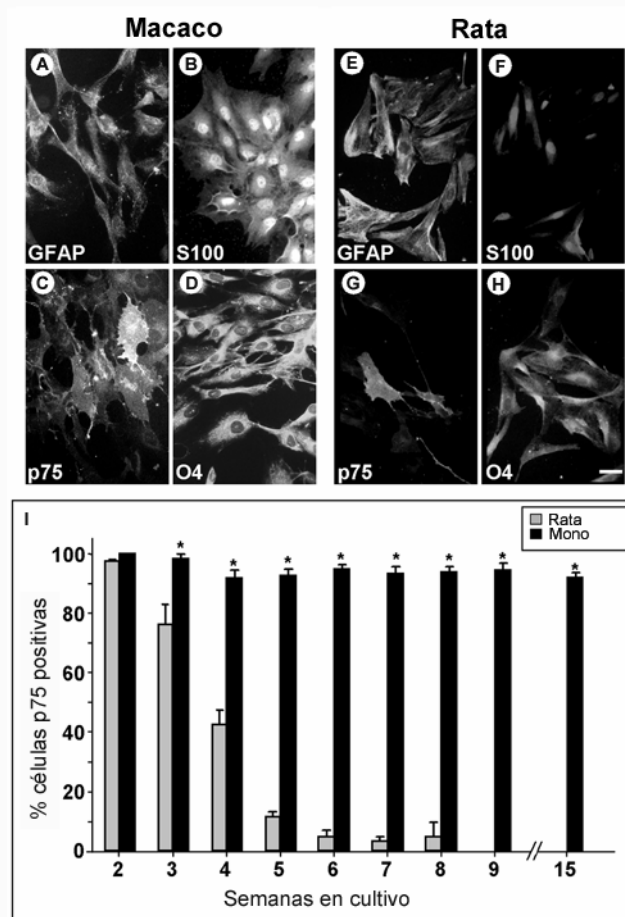


Figura 24. Propiedades inmunocitoquímicas de la OEG de primate y roedor adultos tras largo tiempo en cultivo. (A-D) Microfotografías de fluorescencia de OEG de primate tras 15 semanas en cultivo. La OEG de mono expresó GFAP (A), S100 (B), p75 (C), y O4 (D), durante todo el periodo en cultivo analizado. (E-H) Microfotografías de fluorescencia de cultivos de OEG de rata tras 4 semanas *in vitro*. Aunque tras la tercera semana en cultivo, la OEG de rata mantuvo la expresión de GFAP (E), S100 (F), O4 (H), se produjo un dramático descenso en la expresión de p75 (G). (I) Histograma que muestra el porcentaje de células p75 positivas en cultivos de OEG de rata (gris) y de mono (negro) tras diferentes tiempos *in vitro*. Los datos representan la media  $\pm$  ESM para los cultivos de rata ( $n = 6$ ) y de mono ( $n = 4$ ). Las diferencias entre los cultivos de rata y de mono fueron significativas (valores de  $p$  entre 0,05 y 0,001) desde la tercera semana en adelante. La barra de escala representa 100  $\mu\text{m}$ .

#### III.4. Actividad beta galactosidasa asociada a senescencia ( $\beta$ -Gal-AS)

La actividad beta galactosidasa se detecta como una tinción azul y está presente en células en proceso de entrada en senescencia (Dimri *et al.*, 1995). Hemos utilizado este marcador bioquímico en los cultivos de OEG de mono y de rata para evaluar el punto temporal a partir del cual estos cultivos entraron en senescencia, y para poder establecer una correlación con los cambios fenotípicos descritos en el apartado anterior.

La mayoría de las células de mono no mostraron actividad  $\beta$ -Gal-AS durante dos meses y medio *in vitro* y sólo presentaron un fondo azulado muy tenue (Fig. 25). Durante el primer mes, sólo algunas células ( $0,85 \% \pm 1,70$ ) empezaron a mostrar una tinción azul más intensa (Fig. 25 A). Este porcentaje aumentó con el tiempo en cultivo pero nunca alcanzó ni el 10% del número total de células durante los dos primeros meses (Fig. 25 B y 25 I). A partir del segundo mes la cantidad de células marcadas aumentó lentamente y, tras 15 semanas, el 50% de las células mostraron actividad intensa (Fig. 25 C y 25 I). Este aumento dependiente del tiempo en cultivo fue estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ). En comparación, la OEG de rata mostró actividad  $\beta$ -Gal-AS intensa inmediatamente después de la siembra y se mantuvo durante todo el periodo de estudio (Fig. 25). Desde el principio, el 80% de las células mostraron esta tinción, aunque con diferentes grados de intensidad (Fig. 25 D), pero más del 50% presentaron tinción intensa (Fig. 25 I). Esta cantidad de células marcadas intensamente para actividad  $\beta$ -Gal-AS fue aumentando con el tiempo en cultivo (Fig. 25 E y 25 F). Tras el segundo mes, todas las células mostraron actividad  $\beta$ -Gal-AS y, en más del 85% de ellas, la tinción fue muy intensa (Fig. 25 I). Cuando los cultivos de células senescentes se empezaron a dividir espontáneamente después de 10 semanas *in vitro* (ver más abajo), el patrón de tinción para la actividad  $\beta$ -Gal-AS no cambió, y aproximadamente el 85-90% de las células presentaron tinción intensa. Incluso los focos de transformación que se formaron en los cultivos a largo plazo también mostraron un marcaje muy intenso (Fig. 25 G y 25 H) indicando que la inmortalización espontánea no modificó esta actividad asociada a senescencia. El porcentaje de OEG de rata que mostró actividad  $\beta$ -Gal-AS en los cultivos tras dos meses fue significativamente superior que el porcentaje de estas en el periodo inicial ( $p < 0,05$ ; Fig. 25 I).



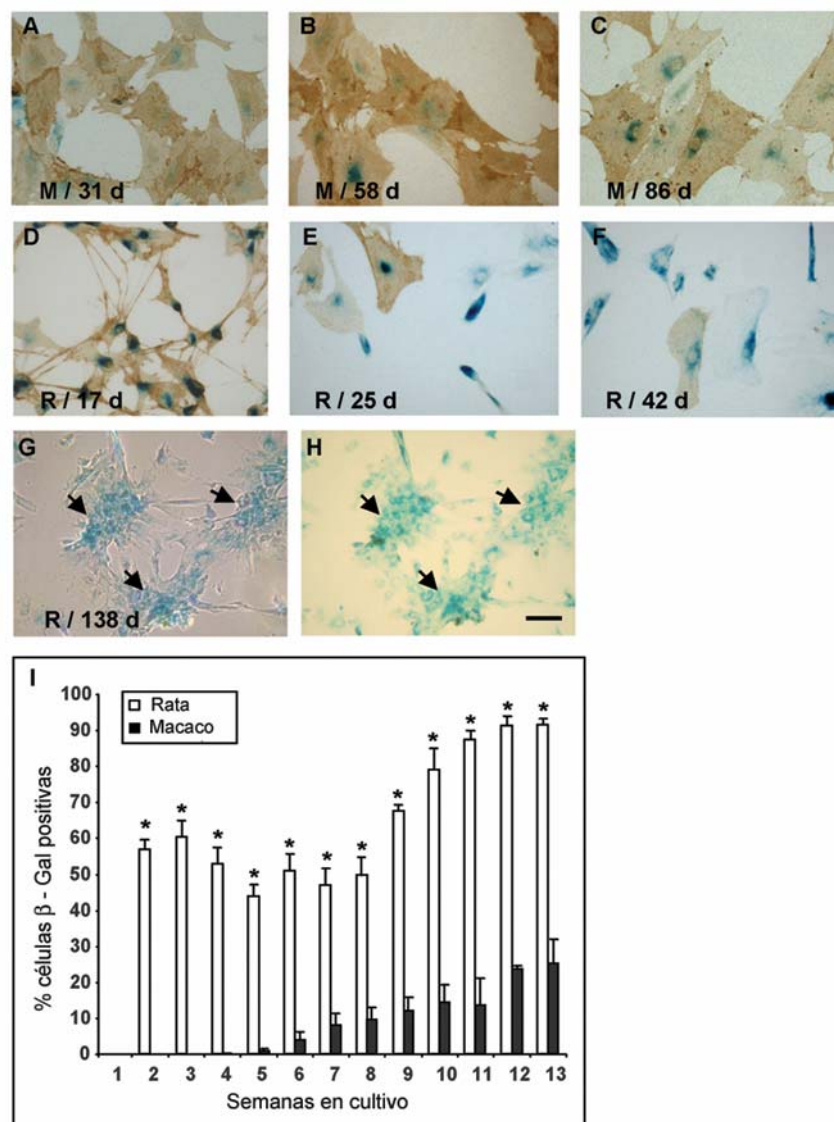


Figura 25. Cambios en la actividad  $\beta$ -Gal-AS en cultivos de OEG de rata y mono con el tiempo en cultivo. (A-C) Cultivos de OEG de mono tras 31 (A), 58 (B), y 86 (C) días *in vitro*. (D-H) Cultivos de OEG de rata tras 17 (D), 25 (E), 42 (F) y 138 (G, H) días *in vitro*. Todos los cultivos están doblemente teñidos para actividad  $\beta$ -Gal-AS (azul) y expresión de p75 (marrón). (G) y (H) muestran el mismo campo con (G) y sin (H) contraste de fases, y las flechas señalan los focos de transformación. (I) Histograma que muestra el porcentaje de células con actividad  $\beta$ -Gal-AS intensa en cultivos de rata (blanco) y mono (negro). Los datos muestran las medias  $\pm$  ESM para cultivos de rata ( $n = 6$ ) y de mono ( $n = 4$ ). La diferencia en el porcentaje de células

**positivas fue estadísticamente significativa en todos los puntos analizados (\* valores de p entre 0,04 y < 0,001). R: rata; M: mono. d: días *in vitro*. Barra de escala: A-F = 100  $\mu$ m; G-H = 80 $\mu$ m.**

En conclusión, la OEG de macaco y de roedor mostraron un patrón diferente de tinción para la actividad  $\beta$ -Gal-AS con el tiempo en cultivo. Mientras la OEG de roedor presentó la tinción azul típica de las células senescentes inmediatamente tras su puesta en cultivo, la mayoría de las células de macaco no mostraron esta actividad durante los dos primeros meses y medio *in vitro*. Estas diferencias en el patrón de actividad  $\beta$ -Gal-AS entre la OEG de primate y de roedor fueron altamente significativas ( $p < 0,001$ ) en todos los puntos analizados.

### **III.5. Efecto del estrés oxidativo causado por las condiciones de cultivo sobre la OEG de roedor y de primate adultos**

Hemos estudiado si la entrada en senescencia de la OEG de rata podría estar relacionada con el estrés oxidativo ocasionado por las concentraciones de oxígeno no-fisiológicas que se dan en los incubadores utilizados habitualmente (21%, oxígeno atmosférico). Esta concentración es superior a los niveles fisiológicos y podría acelerar la entrada en senescencia de algunas células sensibles (Sherr y DePinho, 2000; Parrinello *et al.*, 2003). En este estudio hemos comparado, durante tres meses, la tasa de crecimiento de la OEG mantenida en un incubador estándar, con la tasa de crecimiento manteniendo las células bajo una concentración de oxígeno más similar a la fisiológica (3%), tanto la OEG de mono como la de rata. Hemos observado que los cultivos de OEG de roedor se dividen ligeramente más rápido y presentan una vida media más larga cuando se mantienen en incubadores con menor concentración de oxígeno (condiciones más parecidas a las fisiológicas) (Fig. 26). La OEG no dejó de dividirse durante todo el periodo en cultivo (15 semanas), y por lo tanto, superó la entrada en senescencia replicativa observada cuando se cultivó a concentraciones de oxígeno atmosféricas. Las células mantenidas bajo concentraciones de oxígeno inferiores mostraron una tasa casi constante de división (sobre 1,5 DPs/semana) sin presentar diferencias significativas entre cultivos de corto y largo plazo, y sus DPs totales fueron un 26,4% superiores a las de las células en incubadores estándar. Las diferencias entre la tasa de crecimiento de las células cultivadas a altas y bajas concentraciones de

oxígeno fueron estadísticamente significativas ( $p = 0,013$ ) tres semanas después de haber colocado los cultivos en los incubadores correspondientes (quinta semana en cultivo). La tasa de división continuó siendo significativamente superior desde la quinta semana hasta la undécima ( $p < 0,02$ ), sin mostrar cambios de ahí en adelante. El resto de características fenotípicas asociadas a senescencia descritas anteriormente (actividad  $\beta$ -Gal-AS, y desaparición de p75), no se vieron afectadas por la disminución de los niveles de oxígeno. Por lo tanto, la senescencia replicativa de la OEG de rata parece estar relacionada, al menos en parte, con el estrés oxidativo causado por las condiciones de cultivo. Sin embargo, otras propiedades asociadas a senescencia no se modificaron, y las células mantuvieron una tasa de división típica de células pre-senescentes, sugiriendo que este estado pre-senescente de la OEG de rata debe estar relacionado con otros factores intrínsecos.

En comparación, la tasa de crecimiento de la OEG de mono no se vio afectada por las concentraciones ambientales de oxígeno. Estas células se dividieron a una tasa similar tanto en un incubador estándar como en incubadores de bajo oxígeno, y además, no experimentaron ningún cambio en su fenotipo (no se muestra). La OEG de mono no mostró sensibilidad a las concentraciones no-fisiológicas de oxígeno, comportándose, de nuevo, de forma diferente a la OEG de rata.

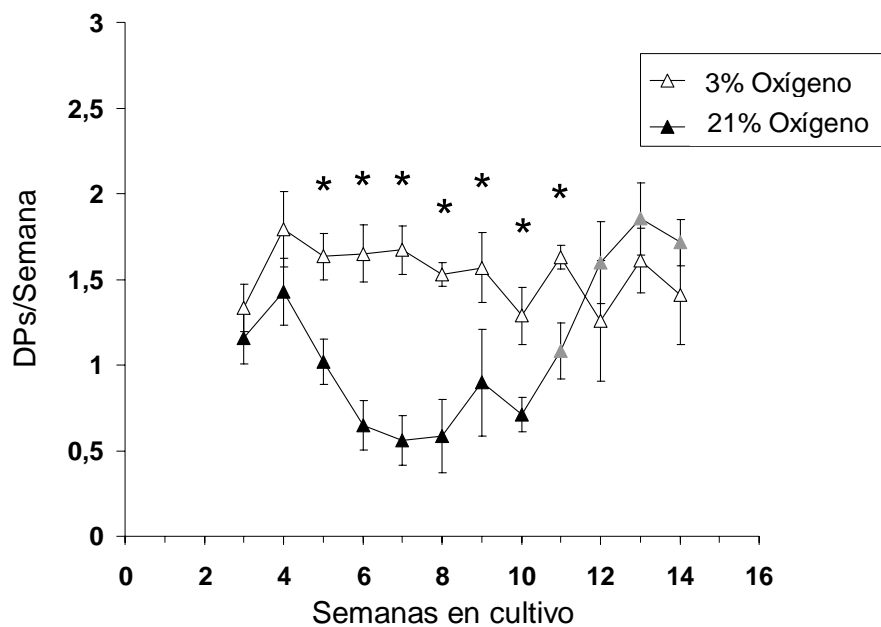


Figura 26. Comparación de la tasa de crecimiento de los mismos cultivos de OEG de rata mantenidos bajo concentraciones alta y baja de oxígeno. El gráfico muestra las DPs/semana de cultivos mantenidos en incubadores con concentraciones ambientales de oxígeno de 21% (triángulo negro) o 3% (triángulo blanco). \* Diferencias significativas (valores de p entre 0,014 y 0,001) entre cultivos mantenidos bajo estas dos condiciones. Los símbolos representan las medias  $\pm$  ESM en 6 cultivos.

## DISCUSIÓN

Durante los últimos años el trasplante de glía envolvente olfatoria (OEG) se ha convertido en una de las estrategias experimentales más prometedoras para reparar los diferentes tipos de lesión de la médula espinal de mamíferos (Imaizumi *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2003; Nash *et al.*, 2002; Plant *et al.*, 2003; Ramon-Cueto and Nieto-Sampedro, 1994; Ramon-Cueto *et al.*, 1998; Ramon-Cueto *et al.*, 2000; Ruitenberg *et al.*, 2005; Verdu *et al.*, 2003). Estas células promueven la recuperación funcional y la regeneración axonal en ratas adultas con lesiones medulares traumáticas de diferente gravedad.

En la primera parte de este trabajo nos hemos centrado en el estudio, *in vivo*, del efecto de la OEG de rata adulta como terapia reparadora en la fase subaguda y crónica de la lesión medular. Puesto que todavía no se ha encontrado ninguna estrategia reparadora que permita mejorar la situación de los pacientes con lesión de la médula espinal, existen muchos pacientes que se encuentran en la fase crónica de la lesión y que necesitan una terapia promotora de la regeneración en su estado. Además, si esta terapia llegara a su fase clínica, la posibilidad de encontrar un tratamiento eficaz frente a las lesiones crónicas de la médula espinal, permitiría a los hospitales el poder realizar los trasplantes pasado un periodo y en el momento en que el paciente ya estuviera estabilizado. Por estos motivos es necesario estudiar si las diferentes terapias que han sido aplicadas con éxito en la fase aguda de la lesión en experimentos animales, conservan su efectividad cuando son aplicadas en la fase crónica de la lesión. Una de estas estrategias reparadoras de las lesiones de la médula espinal, que se sabe es promotora de la regeneración axonal y recuperación funcional de ratas parapléjicas, es el trasplante de OEG. En este trabajo hemos probado la eficacia terapéutica del trasplante de estas células una vez que ha pasado tiempo de la lesión.

Hemos demostrado que la OEG promueve tanto la recuperación funcional de ratas parapléjicas con sección completa en sus médulas espinales, como la regeneración axonal de sus neuronas supraespinales, alcanzando el muñón caudal a la lesión, cuando el trasplante se retrasa hasta cuatro meses post-lesión. La recuperación funcional e histológica fue significativamente superior que en los animales no trasplantados, indicando que al menos durante 4 meses después de la lesión, las neuronas lesionadas conservan la capacidad de responder a estrategias

promotoras del crecimiento. La correlación entre la evolución de la recuperación locomotora y el número de neuronas regeneradas sugiere que estas neuronas podrían estar involucradas en el desarrollo de la actividad locomotora voluntaria. El hecho de poder retrasar los trasplantes de OEG hasta 4 meses sin observar pérdidas en su capacidad promotora de la regeneración, garantiza la disponibilidad del tiempo requerido para la extracción del bulbo olfatorio, la puesta en cultivo, propagación y preparación de la OEG para poder aplicar esta terapia de forma autóloga, permitiendo a su vez la estabilización de los pacientes en el caso de su traslado a la clínica.

### **I. El test de la rampa inclinada es adecuado para evaluar la recuperación funcional de ratas parapléjicas con lesión completa de su médula espinal.**

Debido a la falta en la literatura de tests funcionales especialmente diseñados para ratas con lesión completa, en la mayoría de estudios la evolución locomotora se estudia mediante el test BBB (Basso *et al.*, 1995); (Fraidakis *et al.*, 2004; Lopez-Vales *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2002). Las ratas con lesión incompleta de la médula espinal presentan una recuperación funcional espontánea que se inicia ya en la primera semana después de la lesión y que puede alcanzar su máximo entre 3 y 7 semanas. Esta recuperación espontánea se debe, sobre todo, a fenómenos de plasticidad local de las fibras que han quedado intactas y emisión de brotes axonales, y es mayor o menor dependiendo de la gravedad de la lesión. El test BBB fue diseñado originalmente para cuantificar el déficit motor tras una lesión parcial en la médula espinal, y para evaluar la progresión de esta recuperación motora espontánea, y la calidad y coordinación del movimiento en las ratas lesionadas. A diferencia de lo que ocurre tras una lesión incompleta, las ratas con lesión completa de su médula espinal no presentan una recuperación espontánea de la función motora y no mueven sus patas traseras fácilmente en el campo abierto (Plant *et al.*, 2003); (Verdu *et al.*, 2003); (Liebscher *et al.*, 2005). La calidad de coordinación entre las patas delanteras y traseras es un criterio muy importante en la escala del BBB y este criterio parece carecer de sentido cuando se trata de lesiones completas de la médula espinal (Antri *et al.*, 2002); (Rossignol, 2006) puesto que la posibilidad de controlar dicha coordinación se pierde absolutamente tras una sección completa. Por lo tanto, estos animales necesitan de una recuperación

funcional importante para que en ellos se puedan considerar los parámetros que mide la escala BBB. Además, al no necesitar de sus patas traseras para moverse en el campo abierto, ni estar motivados a hacerlo, ya que pueden deslizarse usando sólo las delanteras, muchos de estos animales no las mueven aunque en otros tests, que requieren del movimiento de las patas traseras para ser superados, sí lo hagan. Esto hace que el test BBB dé muchos resultados falsos negativos, ya que el movimiento de las patas traseras no es imprescindible para realizar la tarea. Aunque algunos autores hayan desarrollado una adaptación de la escala del BBB para poder utilizarlo en sus experimentos con lesión completa de la médula espinal (Antri *et al.*, 2002); (Deumens *et al.*, 2006b) la mayoría de los científicos, consideran que el test BBB no es el más apropiado para evaluar la recuperación motora de las patas traseras tras una sección medular completa (Antri *et al.*, 2002); (Rossignol, 2006). En nuestro caso, y en concordancia con todo lo expuesto anteriormente, hemos realizado el test del BBB semanalmente en todos los animales, y no hemos encontrado diferencias significativas entre los animales trasplantados y los no-trasplantados, aún habiéndolas cuando se emplea un test que requiere que el animal mueva sus patas traseras para superarlo (ver a continuación).

En nuestro laboratorio hemos diseñado un test que permite evaluar la recuperación del movimiento voluntario de las patas traseras de ratas con lesión completa de la médula espinal. Se trata del test de la rampa inclinada previamente descrito (Ramon-Cueto *et al.*, 2000). La recuperación funcional de los animales trasplantados y no trasplantados del presente estudio fue evaluada también mediante dicho test. Hemos observado que en el caso de lesiones medulares completas, los animales no utilizan las patas traseras al máximo de sus posibilidades, a menos que realmente lo necesiten para alcanzar algún objetivo o realizar alguna tarea. Esto es lo que sucede en el test de la rampa inclinada cuando las ratas intentan pasar a una superficie lisa horizontal desde una rejilla inclinada, puesto que sus patas delanteras resbalan en esta plataforma y las patas traseras son las que tienen que impulsar todo su cuerpo para que el animal pueda superar el test. Por el contrario, estas mismas ratas con lesión medular completa, como son capaces de moverse libremente en un campo abierto caminando sólo con sus patas delanteras y sin mucho esfuerzo, no mueven sus patas traseras pues no tienen necesidad de ello para desplazarse.



Los animales con sección completa en su médula espinal pueden presentar movimientos reflejos consistentes en pasos alternantes que se conocen con el nombre de "stepping". El test de la rampa inclinada, cuando se usa de forma adecuada, permite distinguir entre estos reflejos y los movimientos voluntarios de las patas traseras. En un estudio reciente de Lopez-Vales y colaboradores (Lopez-Vales *et al.*, 2005) utilizaron una rejilla con agujeros muy pequeños (12,5 x 12,5 mm) y encontraron que todos los animales (trasplantados con OEG y no trasplantados) fueron capaces de superar el nivel uno y dos (45° y 60°) y en todos los grupos hubo animales que superaron el nivel 4 (90° de inclinación). En nuestra experiencia, cuando se utilizan rejillas con agujeros más pequeños que 25 x 25 mm, los animales son capaces de superar niveles elevados del test debido a que, al estar los peldaños tan cercanos, los animales que presentan reflejos de stepping pueden, durante los mismos y de forma arbitraria, apoyar involuntariamente la pata en la rejilla lo que le sirve para impulsarse. En todos nuestros experimentos, utilizamos rejillas inclinadas con agujeros de 25 x 25 mm (Ramon-Cueto *et al.*, 2000), ya que, al haber una gran distancia entre peldaños, resulta prácticamente imposible que el animal alcance la plataforma lisa si no mueve las patas traseras de forma voluntaria.

Es bien conocido que los espasmos y movimientos reflejos de las extremidades traseras pueden activarse cuando se reciben estímulos de cierta intensidad en la parte baja del abdomen (Pearson, 2001); (Fouad *et al.*, 2005); (Rossignol, 2006). Para descartar que el contacto con la rejilla del test de la rampa de la parte del cuerpo por debajo de la lesión de las ratas parapléjicas pudiera provocar la aparición de este tipo de reflejos, además de la realización del BBB clásico, en nuestro trabajo hemos introducido una modificación al test de comportamiento en campo abierto, colocando una rejilla de las mismas características que la que se utiliza en el test de la rampa inclinada pero doblada, en el centro del campo. De esta forma, los animales para pasar de un lado a otro del campo deben cruzar esta rejilla siendo sometidos a una estimulación de la parte sublesional de su cuerpo que es similar a la que reciben cuando realizan el test de la rampa. Sin embargo, para pasar de un lado a otro los animales no necesitan realizar movimientos voluntarios con sus patas traseras, ya que pueden hacerlo simplemente con sus patas delanteras. De esta forma, este test nos permite distinguir si los animales presentan

algún tipo de componente reflejo por el simple contacto con la rejilla, que pudiera contribuir a ayudarles a superar el test de la rampa. No hemos observado diferencias en ningún grupo de animales, entre los resultados obtenidos utilizando el test de campo abierto clásico (BBB sin rejilla) y el mismo test con rejilla, lo que indica que la estimulación ejercida por la rejilla en las ratas no provoca la aparición en ellas de movimientos reflejos. Por lo tanto, el movimiento que observamos en nuestros animales cuando realizan el test de la rampa no es reflejo, ya que de serlo así, aparecería también cuando estos mismos animales atraviesan el mismo tipo de rejilla en el campo abierto. Otro de los objetivos que se perseguía con dicha modificación del test BBB es comprobar si la realización de movimiento voluntario requiere que los animales estén motivados para llevarlo a cabo. Hemos podido comprobar que esto es así ya que los animales sólo mueven las patas cuando necesitan hacerlo para superar una prueba y recibir su premio. Los animales capaces de superar el test de la rampa, cuando se mueven por el campo abierto con rejilla no mueven sus patas, aunque puedan hacerlo, ya que no lo necesitan para desplazarse por el habitáculo. Esto se debe a que estos animales pueden moverse libremente por el campo abierto, y también trepar por la rejilla introducida en el mismo, tan sólo con las patas delanteras, a diferencia de lo que ocurre en el test de la rampa inclinada, en donde para acceder a la plataforma tienen que usar forzosamente y de forma correcta sus patas traseras. Por lo tanto, nuestros datos apoyan la conclusión de otros científicos de que el test BBB no es apropiado para el estudio de la recuperación funcional en animales con lesiones muy severas de la médula espinal. Según nuestros resultados funcionales, el test más apropiado para la evaluación de la recuperación motora en animales con lesión completa de su médula espinal, parece ser un test en el que los animales se vean obligados a mover sus patas para superar una tarea, como es el caso del test de la rampa inclinada. En este test los animales requieren del movimiento voluntario de sus patas traseras para cumplir una tarea específica, y sólo en el caso de poder realizar ese movimiento, y de ser capaces de soportar su propio peso, consiguen superar el test y recibir su recompensa.

**II. El trasplante de OEG, tras uno y cuatro meses de la lesión, promueve la recuperación funcional de ratas parapléjicas con lesión completa de sus médulas espinales.**

Dos semanas después de la sección medular, todos los animales parapléjicos de nuestro estudio arrastraban sus patas traseras al moverse libremente por un campo abierto. Esto apoya la demostración histológica de que las lesiones medulares fueron completas, ya que por el contrario, los animales con lesión medular incompleta tras el mismo periodo post-lesión muestran recuperación motora espontánea, llegando a presentar desde movimientos leves de tres articulaciones de las patas traseras (puntuación de 4 en la escala del BBB) hasta pasos plantares consistentes y coordinación de las patas delanteras y traseras (puntuación de 16 en la escala del BBB) dependiendo del grado de la lesión (Basso *et al.*, 1995); (Basso *et al.*, 1996). Por lo tanto, nuestros datos conductuales durante las primeras semanas corroboran las observaciones histológicas obtenidas mediante tinción frente a GFAP en la zona de la lesión medular, que demuestran que las lesiones fueron completas en todos los animales del presente estudio.

El estudio de la recuperación funcional en los animales no trasplantados a los que se les inyectó medio de cultivo 1 ó 4 meses después de la lesión, y la ausencia de diferencias entre ambos, demuestra que nuestro abordaje quirúrgico durante la segunda cirugía (la de trasplante o inyección de medio en el caso de animales no trasplantados) y la re-exposición de los muñones medulares mediante la disección del tejido cicatricial que se formó sobre la médula espinal, no ocasiona ningún daño adicional a la médula espinal ni interfiere en la recuperación funcional espontánea que presentan dichos animales. Estos animales presentaron la misma evolución funcional independientemente de que la cirugía y la inyección de medio fueran realizadas tras 1 ó 4 meses de la lesión.

En el presente estudio, los animales trasplantados mostraron una recuperación funcional significativamente superior a la de los no-trasplantados, independientemente del momento en el que se realizaron los trasplantes (1 ó 4 meses después de la lesión). Todos ellos (SA y Cr) (100%) superaron el test de la rampa inclinada. El máximo alcanzado fue el tercer nivel, y lo alcanzó el 70% de los animales trasplantados. Por el contrario, tan sólo uno de los animales No-T logró superar dicho nivel y la mitad de estos animales, que no recibió trasplante, fue

incapaz de superar ni siquiera el mínimo nivel de dificultad del test de la rampa. En este estudio se demuestra por primera vez que los trasplantes de OEG proveniente del BO promueven la recuperación funcional en ratas parapléjicas adultas, con sección medular completa, cuando estos se retrasan hasta 4 meses después de la lesión.

Existen muy pocos trabajos en los que se hayan aplicado diferentes estrategias promotoras de la regeneración en animales con lesión medular completa una vez finalizada la fase aguda de la lesión. Entre estas terapias utilizadas en animales con lesión completa de la médula espinal se encuentran el trasplante de médula espinal fetal y de minibombas osmóticas liberadoras de BDNF y NT-3, 2 y 4 semanas después de la lesión (Coumans *et al.*, 2001), trasplante de lámina propia olfatoria 4 semanas después de la lesión (Lu *et al.*, 2002); (Steward *et al.*, 2006), o el trasplante múltiple de nervio periférico 2, 4 y 8 meses después de la lesión (Fraidakis *et al.*, 2004). Nuestra técnica de trasplante de OEG 1 y 4 meses después de la lesión proporciona la mayor recuperación funcional obtenida hasta el momento en comparación con estos trabajos. Esta recuperación incluye movimiento voluntario de las patas traseras, colocación plantar de las patas y soporte de su propio peso por parte de todos los animales trasplantados.

Los resultados funcionales obtenidos en este estudio en los animales trasplantados, no mostraron diferencias significativas con la recuperación observada en un estudio previo de nuestro laboratorio (Ramon-Cueto *et al.*, 2000), en el que la OEG fue trasplantada en la fase aguda de la lesión ( $p > 0,606$ ). Además, cuando hemos comparado los resultados obtenidos en los animales trasplantados de cada estudio con los controles del otro experimento (de forma cruzada), no hemos observado diferencias significativas entre ambos casos ( $p < 0,02$ ). Estos resultados coinciden con los observados por Fraidakis y colaboradores (Fraidakis *et al.*, 2004) al trasplantar múltiples fragmentos de nervio periférico intercostal en médulas espinales completamente seccionadas de ratas adultas. Estos autores, aunque observaron una menor recuperación funcional que la obtenida en nuestro estudio (los animales no llegaron a soportar su peso corporal), tampoco observaron diferencias significativas en la recuperación funcional entre los grupos a los que se les realizó el trasplante de nervio periférico en la fase aguda o tras 2, 4 y 8 meses post-lesión.

Por lo tanto, podemos afirmar que la capacidad reparadora de la OEG permanece inalterable, siendo igualmente efectiva cuando se trasplanta en la fase aguda, subaguda o crónica de la lesión, al menos en el periodo de tiempo estudiado en este trabajo (4 meses). Estos resultados indican que los trasplantes autólogos de OEG constituyen una terapia viable, puesto que la posibilidad de retrasar estos trasplantes hasta 4 meses después de la lesión ofrece una ventana temporal para la obtención de los bulbos olfatorios, la puesta en cultivo y expansión de las células y la estabilización del paciente requerida antes de ser sometido a la intervención para recibir el trasplante. Estos resultados abren también una vía para la posible terapia en personas con lesiones medulares crónicas, puesto que el hecho de que la terapia funcione en roedores que recibieron el trasplante 4 meses después de sufrir la lesión, periodo en el que se sabe que el proceso cicatricial ya está consolidado y no va a haber más cambios celulares o moleculares en la zona de la lesión, apoya la posibilidad de que esta efectividad pueda permanecer inalterable tras periodos de tiempo superiores.

### **III. La regeneración axonal, a través de la zona de la lesión, de neuronas del tronco del encéfalo parece ser la responsable de la recuperación funcional observada.**

Una cuestión fundamental en cualquier experimento sobre tratamientos reparadores en la médula espinal radica en poder distinguir si la recuperación funcional observada se debe a la reconexión de las fibras regeneradas con las dianas apropiadas situadas por debajo del nivel de la lesión, o a cambios y remodelación en circuitos de excitación (o inhibición) que se encuentren situados por encima y/o por debajo de la lesión (revisado en (Fouad and Pearson, 2004). Para poder atribuir la recuperación funcional a la regeneración de axones debe existir una evidencia histológica de la existencia de fibras creciendo a través de la lesión y en el interior del muñón medular caudal. Con esta finalidad, y también para poder cuantificar el número de neuronas del tronco del encéfalo que regeneraron su axón y crecieron más allá de la zona de la lesión, en este estudio hemos utilizado como trazador neuroanatómico retrógrado la peroxidasa.

Cuando se utiliza un trazador para marcar determinadas neuronas de forma específica, lo más deseable es poder determinar un *sitio de inyección efectivo*, que se corresponda de forma precisa con el volumen de tejido que

queremos que sea susceptible de captar y transportar el trazador (Mesulam, 1982). Cuando la peroxidasa (HRP) se utiliza sin combinar, ha demostrado tener una mayor capacidad de difusión de la deseada. Para poder disminuir el *sitio de inyección efectivo*, hemos empleado un cóctel de HRP con HRP conjugada con la lectina WGA, ya que esta última se une a los terminales sacáridos de la membrana celular y aumenta la afinidad de la HRP por las membranas neuronales. Además, para asegurarnos de que el trazador no difundiera rostralmente por encima del borde caudal (es decir, para que no invadiera el área de la lesión), las inyecciones de HRP-WGA se realizaron a una distancia de 0,5 cm por debajo del borde del muñón medular caudal, y, además, comprobamos mediante el procesamiento histológico de la región de inyección, que este trazador, en ningún caso, alcanzó la cicatriz creada en el muñón caudal. De esta forma, podemos estar seguros de que los únicos axones que han podido captar el trazador han sido aquellos que fueron capaces de cruzar completamente la cicatriz glial y adentrarse en el muñón caudal. Por otro lado, y con la finalidad de detectar el mayor número posible de axones que regeneraron distalmente a la cicatriz, se diseñó un sistema de trazado en 13 puntos para abarcar el grosor total de la médula espinal y el trazador se inyectó a 0,5 cm del borde del muñón.

Dado que la peroxidasa se transporta retrógradamente y se acumula en los somas, hemos identificado y cuantificado el número de neuronas que regeneraron su axón mediante su localización en el tronco del encéfalo. El número de neuronas marcadas en los animales trasplantados con OEG fue más del doble que este número en el grupo de animales no trasplantados. En nuestro estudio nos hemos centrado en las vías descendentes mayores, involucradas en funciones motoras y que parten de núcleos del tronco del encéfalo tales como el rafe, la formación reticular del tronco del encéfalo, el locus coeruleus y el núcleo rojo, que normalmente proyectan sus axones a todos los niveles de la médula espinal (TraceyDJ, 1995). Hemos observado regeneración en todos estos núcleos y también en el complejo vestibular, ocho meses después de realizar los trasplantes, cuando estos se llevan a cabo bien tras 1 ó 4 meses después de la lesión. En nuestro trabajo, hemos demostrado por primera vez que, tras una sección completa de la médula espinal, la OEG es capaz de promover la regeneración axonal de todas estas vías a través de la zona de la lesión, cuando es trasplantada en las fases subaguda (1

mes) y crónica (4 meses). La mayor regeneración se observó en los haces rubroespinal (implicado principalmente en el control motor durante la locomoción simple (Whishaw *et al.*, 1998)) y rafespinal (responsable de efectos neuromoduladores de funciones motoras como la facilitación de la actividad locomotora rítmica (Gerin and Privat, 1998)), mientras que la máxima regeneración promovida por la OEG, medida en función de la diferencia observada entre los animales trasplantados y los no trasplantados se observó en el haz coeruloespinal (que participa en modular la actividad de las motoneuronas espinales (Tanaka *et al.*, 1997)), cuya regeneración fue ocho veces superior a la observada en los animales no trasplantados. Los haces reticuloespinal (importante en la iniciación de la actividad locomotora y en el mantenimiento de la postura, entre otras funciones, revisado en (Deumens *et al.*, 2005)) y vestibuloespinal (involucrado en la locomoción al caminar, trotar y galopar en las ratas (Clarac *et al.*, 1998)) presentaron una regeneración tres veces superior a la de los animales no trasplantados. Existe una correlación positiva entre el número de neuronas del tronco del encéfalo que regeneran su axón y el grado de recuperación funcional que presentan los animales, lo que sugiere que el crecimiento axonal observado en todas estas vías es el responsable de la recuperación funcional observada.

Aunque otros autores hayan trasplantado OEG en la fase aguda de la lesión, corroborando nuestros resultados previos (Ramon-Cueto and Nieto-Sampedro, 1994); (Ramon-Cueto *et al.*, 1998); (Ramon-Cueto *et al.*, 2000), son muy pocos los estudios en los que estos trasplantes de OEG se realizaron pasado tiempo de la lesión y lo hacen en un modelo de lesión incompleta de la médula espinal (Lu *et al.*, 2002); (Kwon *et al.*, 2002); (Plant *et al.*, 2003); (Keyvan-Fouladi *et al.*, 2003); (Keyvan-Fouladi *et al.*, 2005); (Lopez-Vales *et al.*, 2005); (Barakat *et al.*, 2005). Al tratarse de lesiones incompletas, se siembra la duda de que el crecimiento de fibras observado en estos trabajos sea debido a una regeneración real o sea debido a la ramificación de axones no lesionados, y por tanto, que la causa de la recuperación funcional sea debida o no a regeneración axonal (Kwon *et al.*, 2002); (Keyvan-Fouladi *et al.*, 2003); (Plant *et al.*, 2003); (Keyvan-Fouladi *et al.*, 2005). En un estudio de Plant y colaboradores (Plant *et al.*, 2003) observaron regeneración axonal en neuronas del núcleo rojo, de la formación reticular, del complejo vestibular y del rafe, cuando trasplantaron OEG siete días después de la lesión, en modelos de

contusión. Curiosamente, sus resultados muestran, en general, un menor número de neuronas regeneradas respecto a nuestros resultados. Estas diferencias podrían ser debidas a la utilización de una técnica diferente de trazado (ellos utilizaron Fluorogold inyectado sólo en dos puntos de la médula espinal) o también pueden ser debidas al menor tiempo de supervivencia de los animales, ya que sólo los dejaron sobrevivir 2 meses después del trasplante, lo cual parece un tiempo excesivamente corto para observar regeneración de vías de larga distancia. Además, los autores de este estudio utilizan el término "sparing/regeneration" porque al elegir la contusión como su modelo de lesión no son capaces de distinguir entre axones regenerados o axones que permanecieron intactos a la lesión. En nuestro estudio hemos elegido la sección completa para asegurarnos de que las neuronas marcadas con el trazador son únicamente aquellas que han sido capaces de regenerar sus axones seccionados a través de la lesión y de alcanzar el área de inyección del trazador. Además, hemos dejado a los animales sobrevivir 8 meses después de los trasplantes, tiempo suficiente para poder observar regeneración a larga distancia.

Nuestro trabajo es el único existente en el que se trasplanta OEG de bulbos olfatorios adultos en ratas con lesión completa de la médula espinal, en la fase subaguda (1 mes) y crónica (4 meses) de la lesión. Sólo hay un grupo que haya utilizado en sus estudios de trasplante de OEG un modelo de lesión completa de la médula espinal (Lu *et al.*, 2002). Sin embargo, este laboratorio realiza implantes de células del epitelio olfatorio (SNP) y no de OEG pura del bulbo olfatorio (SNC) y, además, tan sólo retrasan la aplicación del trasplante 1 mes con respecto a la lesión, lo cual es considerado fase subaguda. En este estudio Lu y colaboradores observaron regeneración de las neuronas del rafe. Sin embargo, este trabajo ha sido repetido recientemente por Steward y colaboradores (Steward *et al.*, 2006) y ellos no observaron recuperación funcional ni regeneración axonal cuando trasplantaron lámina propia olfatoria un mes después de la sección completa de la ME. Estos nuevos resultados ponen en duda la capacidad de la OEG proveniente del epitelio olfatorio para promover la regeneración axonal y la recuperación funcional cuando es trasplantada en la médula espinal. En ambos estudios (Lu *et al.*, 2002; Steward *et al.*, 2006) a diferencia de nuestro caso, se utilizó el SNP como fuente de OEG (el epitelio olfatorio). Los estudios realizados hasta el momento



utilizando OEG del BO han obtenido resultados positivos (Imaizumi *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2003; Nash *et al.*, 2002; Plant *et al.*, 2003; Ramon-Cueto and Nieto-Sampedro, 1994; Ramon-Cueto *et al.*, 1998; Ramon-Cueto *et al.*, 2000; Ruitenberg *et al.*, 2005; Verdu *et al.*, 2003), mientras que los grupos que utilizan OEG proveniente del epitelio olfatorio no encuentran resultados positivos, a excepción del grupo de Lu y colaboradores (Lu *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2002). Los trasplantes de los grupos que utilizan el epitelio olfatorio como fuente de OEG, contienen grandes cantidades de células de Schwann, ya que actualmente no existe ningún método capaz de separar la OEG de las células de Schwann, ni marcadores que permitan distinguir en las muestras ambos tipos celulares, por lo tanto, en estos estudios los autores desconocen el porcentaje real de OEG que están trasplantando. Incluso podría darse el caso de que estuviesen trasplantando únicamente células de Schwann ya que los marcadores que utilizan para identificar la OEG son p75 y S100, ambos expresados por las células de Schwann. Una de las principales causas de la falta de regeneración observada podría ser la incapacidad que muestran las células de Schwann para migrar y mezclarse con las células del SNC (en especial con los astrocitos), además de la mayor expresión de moléculas inhibitoras de la regeneración por parte de los astrocitos, que provocan estas células (Barnett and Riddell, 2004; Lakatos *et al.*, 2000; Lakatos *et al.*, 2003). De este modo, las células de Schwann presentes en los trasplantes podrían estar contrarrestando el efecto promotor de la regeneración de la OEG. A diferencia de estos trabajos, nosotros hemos utilizado OEG purificada a partir del SNC (bulbo olfatorio) y por lo tanto nuestros trasplantes no contienen células de Schwann.

Por lo tanto, nuestros resultados demuestran, por primera vez, que los haces rafespinal, rubroespinal, reticuloespinal, vestibuloespinal y coeruloespinal responden a los trasplantes de OEG proveniente del BO adultos realizados hasta cuatro meses después de practicar una sección completa de la médula espinal, siendo capaces de atravesar la zona de la lesión y de invadir el muñón caudal. Además, existe una buena correlación estadística positiva entre el número de neuronas del tronco del encéfalo, de proyección descendente a la médula espinal, que acumularon el trazador (regeneradas) y el grado de recuperación funcional observado, de tal forma que los animales que presentaron una mayor recuperación funcional son también los que mostraron un mayor número de neuronas que regeneraron su

axón distalmente. Esto sugiere que dichas neuronas que han regenerado su axón a través de la lesión pueden estar implicadas en la recuperación funcional observada en los animales parapléjicos trasplantados.

#### **IV. La OEG trasplantada en las fases subaguda y crónica de la lesión no promueve la regeneración del haz corticoespinal a través de la zona de la lesión.**

En el presente estudio también hemos analizado la presencia de neuronas marcadas con trazador en la corteza motora y no hemos observado regeneración significativa de los axones que componen el haz corticoespinal a través de la zona de la lesión. Sólo un pequeño número de axones fueron capaces de cruzar la cicatriz y de captar el trazador pero no hubo diferencias significativas entre los animales trasplantados y los no trasplantados. Según estos resultados, la OEG no parece promover la regeneración del haz corticoespinal cuando es trasplantada en la fase subaguda y crónica de la lesión. Coincidiendo con otros trabajos (Schwab *et al.*, 1993); (Schnell *et al.*, 1994); (Bregman *et al.*, 1995); (Davies *et al.*, 1997), el haz corticoespinal parece ser más sensible que otros haces al efecto inhibitorio de las moléculas inhibitorias presentes en la cicatriz glial. A diferencia de los primates, en la rata el haz corticoespinal está involucrado en funciones más sensitivas que motoras las cuales favorecen una mayor destreza en la realización de determinadas funciones motoras, como la de agarrar, sujetar y manejar la comida, pero está menos involucrado en la locomoción simple (Whishaw *et al.*, 1998); (Metz *et al.*, 2000). Esta función en roedores podría ser uno de los motivos por los que la ausencia de regeneración significativa en este haz no parece influir en la recuperación de la función motora de los animales trasplantados, según el test de la rampa inclinada. Otra razón podría ser que en los animales trasplantados existe una regeneración de todos los haces del tronco del encéfalo que son relevantes en el establecimiento y mantenimiento de la marcha. Estos haces podrían estar supliendo la falta de actividad del haz corticoespinal a través de mecanismos adaptativos. Por otra parte, el haz corticoespinal (sobre todo en primates) está más implicado en la realización de movimientos finos que no parecen ser tan importantes para el establecimiento de patrones generales de marcha.

A diferencia de nuestros resultados presentados en esta tesis, en un trabajo previo de nuestro laboratorio sí que se observó regeneración del haz corticoespinal

cuando se trasplantó OEG en la fase aguda de la lesión medular completa (Ramon-Cueto *et al.*, 2000). Sin embargo, en la mayoría de los animales trasplantados en dicho estudio, los axones corticoespinales evitaron crecer en el interior de la médula espinal, haciéndolo por la superficie de ésta, a través del tejido conjuntivo de la piamadre en el cual había migrado la OEG. Estos resultados no son incompatibles con los que observamos ahora ya que, en este trabajo, el trazador utilizado para detectar la regeneración axonal fue inyectado en trece puntos del interior de la médula espinal, de modo que los posibles axones que pudieran haber crecido por la superficie medular no son susceptibles de captar dicho trazador. A diferencia de nuestro trabajo, en el trabajo previo no se observó ningún axón, ni del haz corticoespinal ni otros, regenerando a través de la cicatriz en los animales no trasplantados, mientras que en nuestro estudio, un pequeño número de axones fue capaz de regenerar en los animales no trasplantados. En el presente trabajo, a diferencia del trabajo realizado en el año 2000 (Ramon-Cueto *et al.*, 2000), se ha estabilizado la columna vertebral mediante puentes de cemento dental, que como discutiré a continuación, podría haber promovido la aproximación y la mejor aposición de los muñones medulares, favoreciendo cierto grado de regeneración axonal espontánea tanto en los animales trasplantados como en los no trasplantados. Por último, las diferencias en los resultados obtenidos en los dos estudios podrían deberse a que en el caso del haz corticoespinal, la presencia de la OEG podría ser necesaria desde los primeros momentos después de la lesión, de modo que las neuronas de la corteza motora que dan origen a este haz podrían haber perdido su capacidad de regenerar en respuesta a la OEG una vez transcurrido cierto tiempo después de la lesión.

En un trabajo realizado por el grupo de Raisman y colaboradores (Li *et al.*, 1997); (Li *et al.*, 1998) observaron regeneración del haz corticoespinal cuando se trasplantó OEG inmediatamente después de una lesión electrolítica unilateral de dicho haz. Sin embargo, estos resultados no parecen ser del todo concluyentes puesto que se sabe que los axones de la porción de haz corticoespinal no lesionada son capaces de emitir colaterales que interaccionan con neuronas propioespinales, reestableciendo de nuevo el circuito intraespinal (Bareyre *et al.*, 2004).

Por otro lado, nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos en otros trabajos en los que tampoco se observó regeneración significativa del haz corticoespinal cuando se trasplantó OEG en la fase aguda, tras una lesión contusiva (Takami *et al.*, 2002), de la hemisección (Ruitenber *et al.*, 2005); (Deumens *et al.*, 2006a), o 4 semanas después de la hemisección de la médula espinal (Deumens *et al.*, 2006b). En concreto, en el trabajo de Ruitenber y colaboradores observaron regeneración de axones corticoespinales únicamente cuando trasplantaron OEG que había sido modificada para expresar la neurotrofina NT-3. Se sabe que las neuronas del haz corticoespinal son sensibles a NT-3, y que esta neurotrofina estimula el crecimiento de vías motoras importantes tras lesiones medulares, y particularmente del haz corticoespinal, tanto sola como en combinación con otros factores (Schnell *et al.*, 1994); (Senut *et al.*, 1995); (Grill *et al.*, 1997a); (Blits *et al.*, 2000). Las neuronas que forman el haz corticoespinal en adultos expresan el receptor de NT-3 de alta afinidad, TrkC y lo continúan expresando después de una lesión (Ruitenber *et al.*, 2005), por lo que esta neurotrofina parece ser un factor crítico para el crecimiento del haz corticoespinal. La OEG expresa una serie de factores neurotróficos como NGF, NT-4/5, neuregulina y BDNF (Ramon-Cueto and Avila, 1998); (Thompson *et al.*, 2000); (Boruch *et al.*, 2001); (Woodhall *et al.*, 2001), pero no expresa NT-3 (Boruch *et al.*, 2001); (Woodhall *et al.*, 2001), lo cual podría ser uno de los principales motivos por los que estas células no promueven la regeneración de este haz.

### **V. Las neuronas del tronco del encéfalo conservan la capacidad de responder a factores promotores de la regeneración, al menos, durante cuatro meses después de la lesión.**

La regeneración de axones descendentes procedentes del tronco del encéfalo en el interior del muñón caudal de la médula espinal coincide con los resultados obtenidos en el estudio previo en el que los trasplantes se realizaron en la fase aguda de la lesión (Ramon-Cueto *et al.*, 2000). Esta capacidad por parte de las neuronas, de responder de forma similar tanto en la fase aguda como en la subaguda, como en la crónica de la lesión se ha observado también cuando se utiliza como estrategia reparadora el trasplante de fibroblastos modificados genéticamente para producir NGF (Grill *et al.*, 1997b). En este estudio, el

crecimiento axonal fue el mismo en los animales trasplantados en la fase aguda, o tres meses después de una lesión contusiva. Sin embargo, al tratarse de una lesión incompleta, este trabajo no evalúa la respuesta regenerativa pura de las neuronas ya que podrían existir mecanismos adaptativos de las neuronas y los haces no lesionados, activos pasado tiempo de la lesión, y que podrían estar favoreciendo esta respuesta positiva tardía. En una revisión reciente (Houle and Tessler, 2003) se realizó una recopilación de los diferentes estudios que describen como algunos axones conservan la capacidad de responder a factores promotores de regeneración tras varios meses después de la lesión. Sin embargo, en casi todos estos estudios las lesiones aplicadas fueron incompletas, de modo que resulta difícil distinguir si quien responde a estos estímulos son los axones lesionados, produciéndose una regeneración real, o los axones intactos que envían colaterales, produciéndose brotes axonales ("sprouting" reactivo). Al ser nuestro modelo la lesión completa de la médula espinal, tenemos la certeza de que en nuestros animales la recuperación observada tiene como base una respuesta regenerativa de las neuronas dañadas. Por lo tanto, los resultados de nuestro trabajo demuestran, por primera vez, que neuronas lesionadas por axotomía son capaces de responder a estrategias reparadoras, al menos, hasta cuatro meses de haber sido lesionadas. Además, nuestro trabajo es el primero en el que se demuestra que el trasplante de OEG de bulbo olfatorio, retrasado en el tiempo, uno y cuatro meses después de una sección completa de la médula espinal, promueve respuestas regenerativas en neuronas de diferentes núcleos del tronco del encéfalo, que son relevantes en la iniciación y la modulación de los patrones de locomoción.

Por otro lado, el análisis más detallado mediante el trazado retrógrado y la cuantificación del número de neuronas regeneradas, que hemos realizado en este estudio, demuestra por vez primera, la ausencia de diferencias significativas en el número de neuronas marcadas entre los animales trasplantados 1 y 4 meses después de la lesión. Es decir, la respuesta regenerativa de las neuronas se mantiene prácticamente igual a lo largo de los cuatro meses que siguen a la lesión. Sin embargo, cabe resaltar que, a pesar de esta ausencia de diferencias estadísticamente significativas, el número de neuronas contadas fue ligeramente superior en todos los núcleos del grupo de animales trasplantados en fase crónica

respecto a los trasplantados en la fase subaguda. Esta pequeña diferencia podría ser debida a ligeros cambios que pudieran existir entre 1 y 4 meses después de la lesión en el tejido lesionado. Por ejemplo, en las lesiones contusivas en ratas se ha demostrado que existe un desarrollo de la patología que continúa hasta 3 ó 3,5 meses después de la lesión (Hill *et al.*, 2001), y una vez las cavidades estuvieron completamente formadas permanecieron sin experimentar ningún cambio durante los 8 meses siguientes. En base a estos datos histológicos, podría ocurrir que cuando la OEG se trasplanta cuatro meses después de la lesión, los axones podrían encontrar un entorno más estable y sin la presencia de células inflamatorias que pudieran intervenir en la respuesta regenerativa. Esto podría favorecer una mejor respuesta regenerativa en los animales trasplantados en la fase crónica. Sin embargo, no parece que el entorno afecte demasiado a la capacidad reparadora de la OEG puesto que las diferencias en el número de neuronas que regeneraron su axón no fueron significativas.

### **VI. La fijación de la columna vertebral con puentes de cemento promueve una discreta recuperación funcional espontánea en los animales no trasplantados.**

Hemos observado una ligera recuperación espontánea en los animales no trasplantados y en dos ratas del grupo Cr antes de ser trasplantadas a los 4 meses post-lesión. Los animales no trasplantados presentaron una discreta recuperación funcional que evolucionó desde el segundo mes hasta el mes sexto post-lesión, momento en el cual los animales alcanzaron su máxima recuperación espontánea. Cuando se comparó la recuperación funcional observada en los animales parapléjicos no trasplantados de este estudio con la de los del estudio previo (Ramon-Cueto *et al.*, 2000), a los que no se estabilizó la columna vertebral ni se realizó rehabilitación, las diferencias fueron estadísticamente significativas en los meses 5, 6 y 7 post-lesión. Existen dos diferencias fundamentales entre los grupos de animales no-trasplantados de los dos estudios. En primer lugar, los animales del presente estudio recibieron masajes diarios en todos los músculos situados por debajo del nivel de la lesión para evitar la atrofia muscular y las deformaciones. Estos pequeños ejercicios de rehabilitación diarios podrían ser la causa, en parte, de la recuperación espontánea observada en los animales que no recibieron tratamiento, promoviendo la actividad espontánea de las redes del "generador

central de movimiento" situado en la región lumbar de la médula espinal (Jeffery and Blakemore, 1999); (Molteni *et al.*, 2004).

Por otra parte, en todos los animales de este estudio hemos utilizado puentes fabricados con cemento dental para fijar la columna vertebral. Es bien conocido que la laminectomía de tres segmentos vertebrales normalmente resulta en una fuerte lordosis que puede dificultar mucho la recuperación funcional (Machida *et al.*, 2005). Los puentes de cemento podrían haber facilitado el acercamiento y la mejor alineación de los muñones medulares, y es posible que una menor distancia entre los muñones permita cierto grado de regeneración axonal espontánea y la consecuente recuperación funcional observada. Existen estudios en los que se utilizan diferentes instrumentos para fijar la columna vertebral, sin embargo en ninguno de ellos estudian si se produce regeneración axonal espontánea en los animales que tan sólo reciben la fijación (Cheng and Olson, 1995). Concretamente, el grupo de Liu utilizó alambres de acero inoxidable para la fijación interna de la columna vertebral después de la sección completa de la médula espinal en roedores y, observó una menor distancia entre los muñones medulares y, en estos animales, un mayor número de brotes axonales en la zona de la cicatriz, pero no describen que fibras nerviosas en regeneración crucen la misma.

En el caso de nuestros puentes de cemento, como parte de la tesis doctoral de Beatriz Llamusí, se ha medido la distancia entre los muñones medulares de ratas cuyas médulas espinales fueron completamente seccionadas, con y sin cemento dental, observando una menor distancia entre muñones en aquellos animales en los que se colocó el puente de cemento para estabilizar la columna vertebral.

Además existe una correlación lineal positiva entre la recuperación funcional observada en nuestros animales control no-trasplantados y el número de neuronas que regeneraron su axón, por lo tanto, dicho acercamiento de los muñones pudo facilitar este crecimiento axonal observado.

Tanto la rehabilitación como la fijación de la columna se realizaron del mismo modo en los animales trasplantados y en los no trasplantados del presente estudio, siendo la única diferencia entre ellos el trasplante de OEG. Por lo tanto, en cualquier caso, las diferencias observadas entre los grupos trasplantados (SA y Cr) y el grupo No-T, sólo pueden ser explicadas en base a las propiedades

regeneradoras de la OEG trasplantada, tanto un mes como cuatro meses después de la lesión.

#### **VII. Existen diferentes mecanismos mediante los cuales la OEG podría estar promoviendo la regeneración axonal.**

Se sabe que los axones lesionados desarrollan bulbos de retracción y que después de los intentos iniciales de regeneración, experimentan cierto grado de retroceso (Fernandez *et al.*, 1993); (Hill *et al.*, 2001). Esta retracción axonal podría tener una influencia negativa en la respuesta regenerativa de los axones lesionados en el caso de la aplicación de terapias aplazadas cierto tiempo después de la lesión. Tal y como se revisó en el trabajo de Houle (Houle and Tessler, 2003), existe cierta controversia acerca de la distancia de la lesión a la que permanecen los axones lesionados. En un trabajo de este mismo grupo (Houle and Jin, 2001) observaron una rápida retracción (en una semana) de los haces rubroespinal, vestibuloespinal y reticuloespinal a una distancia media de aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ . Esta distancia de los terminales axónicos lesionados desde la zona de la lesión no experimentó cambios en un periodo de 3 meses y medio. En el presente estudio (así como en nuestros estudios previos de trasplante) la OEG se inyectó aproximadamente a 1 mm desde el borde de los muñones rostral y caudal. Esto sugiere, que en nuestro caso, la OEG se ha colocado a la distancia en la que puede permanecer en contacto con los axones lesionados, pudiendo entonces ejercer su efecto de guía, neurotrófico, tal y como parece ocurrir cuando se trasplanta en la fase aguda (Ramon-Cueto *et al.*, 1998); (Ramon-Cueto *et al.*, 2000); (Woodhall *et al.*, 2001); (Lipson *et al.*, 2003); (Fairless and Barnett, 2005), promoviendo de esta forma la regeneración axonal observada.

Por otro lado, se ha demostrado recientemente que los trasplantes de OEG en el epicentro de la zona de la lesión conducen a una disminución en la capacidad migratoria y a una gran pérdida de viabilidad de estas células, observada tres meses después del trasplante (Barakat *et al.*, 2005). Consecuentemente, estos autores no observaron ninguna regeneración axonal, ni recuperación funcional, que fueran significativas en las ratas con este tratamiento. Aunque el trasplante se llevó a cabo dos meses después de la contusión, cuando ya ha disminuido la presencia de células inflamatorias (Hill *et al.*, 2001), la OEG



parece ser susceptible al entorno hostil del epicentro de la lesión. En el presente estudio, así como en experimentos previos de nuestro laboratorio, la OEG se trasplantó en tejido sano próximo a la lesión, lo que parece preservar su viabilidad y favorecer su migración (Boruch *et al.*, 2001) (como se observó gracias al marcaje con hoechst de la OEG), promoviendo así el crecimiento axonal.

Los trasplantes de OEG en la fase aguda tienen un efecto protector sobre médulas espinales lesionadas, disminuyendo la formación de cavidades y de tejido cicatricial después de una lesión medular completa (Ramon-Cueto *et al.*, 2000); (Verdu *et al.*, 2001); (Lopez-Vales *et al.*, 2005). En estos trabajos se propone la posibilidad de que, además de la gran cantidad de factores neurotróficos y promotores de la regeneración producidos por la OEG, estas células podrían ejercer cierta influencia sobre células, como la microglía o los leucocitos, que se infiltran en el parénquima medular durante las primeras horas de la lesión medular, modulando su respuesta pro-inflamatoria. En el presente estudio hemos demostrado que la OEG trasplantada en la fase subaguda de la lesión tiene el mismo efecto al disminuir tanto el tejido cicatricial formado entre los dos muñones medulares como las cavidades. Además, esta preservación del tejido, se correlaciona con los niveles de recuperación funcional que presentan los animales. Tanto la fase aguda como la subaguda son etapas muy inestables, en las que se suceden cambios de forma continuada en la composición celular y molecular de la zona lesionada. En cambio, se considera que la fase crónica es el estado de la lesión más estable, a partir del cual ya no se espera observar grandes cambios histológicos ni funcionales en el individuo lesionado. En animales de experimentación, aproximadamente a partir del tercer mes, las células inflamatorias han desaparecido, tampoco queda rastro del edema inicial y los pequeños quistes que se fueron formando aproximadamente un mes después de la lesión, aparecen rodeados por tejido cicatricial y adquieren una forma perfectamente delimitada (Hill *et al.*, 2001). Por este motivo, cuando los trasplantes de OEG se realizan en la fase crónica de la lesión, estas células encuentran un tejido mucho más estable, ya que las cavidades ya están formadas, y ya no hay inflamación. En base a esto, es posible que en este caso los efectos neuroprotector y glioprotector que tiene la OEG no contribuyan a su capacidad regeneradora, siendo, probablemente y únicamente, su capacidad de promover el crecimiento

axonal la responsable de la reparación tisular en estos animales. Sin embargo, en nuestro estudio hemos observado también una disminución en el volumen de tejido cicatricial y de las cavidades cuando la OEG se trasplanta tras 4 meses de la lesión, presentando un mayor acercamiento entre los muñones medulares. En este caso, una explicación a nuestros resultados podría ser que la OEG promoviese la neoformación tisular en esta fase de la lesión. Estudios previos han demostrado la capacidad de la OEG para promover cierto grado de angiogénesis en la zona de la lesión (Richter *et al.*, 2005), siendo significativamente mayor el número de vasos sanguíneos de nueva formación en los animales que recibieron trasplante de OEG que en los animales a los que se les inyectó medio de cultivo (Richter *et al.*, 2005). Estos resultados parecen ir en la misma dirección que nuestra hipótesis de que la OEG podría haber promovido la neoformación tisular al favorecer la migración de células a la zona de la lesión. Sin embargo, esta hipótesis queda aún por demostrar ya que en nuestros experimentos no es posible distinguir entre los procesos de preservación y de neoformación tisular.

La OEG secreta una serie de factores neurotróficos (Ramon-Cueto and Avila, 1998); (Wewetzer *et al.*, 2001); (Boruch *et al.*, 2001); (Woodhall *et al.*, 2001); (Chuah and West, 2002) y de proteínas de matriz extracelular promotoras del crecimiento de neuritas (Doucette, 1990); Ramon-Cueto y Nieto-Sampedro, 1992; Franceschini y Barnett, 1996; Kafitz y Greer, 1999; Barnett *et al.*, 2000; Fairless y Barnett, 2005), que pueden ejercer este efecto promotor del crecimiento axonal tanto por contacto celular como a través de la secreción de factores solubles (Chung *et al.*, 2004). Estas moléculas producidas por la OEG podrían también favorecer su papel neuroprotector, glioprotector, así como facilitador de la proliferación de las células supervivientes.

En estudios previos se ha demostrado que la disección de tejido cicatricial, que incluye células gliales como los astrocitos reactivos, aumenta el déficit funcional tras una lesión medular (Faulkner *et al.*, 2004), ya que estas células gliales producen factores tróficos que facilitan la supervivencia celular. Por lo tanto, el favorecer que se produzca una disminución de la degeneración del tejido, del retroceso axonal, y de la formación de cavidades después de una lesión medular, así como el potenciar la neoformación tisular, podría favorecer que la zona de la lesión presentara una mayor cantidad de tejido que pudiera hacer de sustrato

para el crecimiento axonal. Las propiedades mencionadas previamente de la OEG podrían estar facilitando que esta situación se potenciara.

Estudios previos proponen que la OEG podría promover la regeneración axonal gracias a su buena interacción con los astrocitos del SNC (Ramon-Cueto *et al.*, 1998; Lakatos *et al.*, 2000; Lakatos *et al.*, 2003), del mismo modo que lo hace en el sistema olfatorio primario, abriendo la interfase astrocítica en la zona de la lesión. Esto permitiría la entrada de las fibras nerviosas en regeneración en el interior del trasplante y su elongación a su través y en el interior del tejido huésped. Las señales moleculares que subyacen a los mecanismos de apertura de la cicatriz astrocítica quedan todavía por ser elucidadas. Su descubrimiento podría conducir a grandes beneficios terapéuticos ya que podría permitir el diseño de fármacos que actuaran en esta dirección. La regeneración de axones a través de los trasplantes de OEG indica que existe suficiente aporte endógeno de factores de crecimiento axonal en el sistema huésped/trasplante como para mantener la regeneración necesaria que conduce a niveles de recuperación funcional significativos (Ramon-Cueto y Valverde, 1995; Ramon-Cueto y Avila, 1998; Santos-Benito y Ramon-Cueto, 2003). El aporte exógeno de factores mediante la combinación de diferentes terapias podría aumentar este crecimiento axonal (Ruitenberg *et al.*, 2003; Cao *et al.*, 2005).

Con todo lo expuesto hasta aquí, hemos demostrado por primera vez, que los trasplantes de OEG pueden ser retrasados al menos 4 meses después de la lesión, promoviendo la regeneración axonal y la recuperación funcional en ratas adultas con sección completa de su médula espinal. En el caso del traslado de esta terapia a la clínica, se podrían realizar trasplantes autólogos, ya que, esta posibilidad de retrasar los trasplantes, permite disponer del tiempo necesario para la obtención de los bulbos olfatorios, para la puesta en cultivo y la preparación de la OEG antes de que estas células pierdan sus propiedades promotoras de la regeneración. Además, este tiempo sería también suficiente para permitir la estabilización de los pacientes antes de realizar la cirugía de trasplante, en el caso de la aplicación de esta terapia en lesiones recientes.

**VIII. Los bulbos olfatorios de primate proporcionan OEG no-senescente mientras que la OEG de roedor se encuentra en estado pre-senescente y envejece pronto en cultivo.**

Como paso previo a la utilización de la OEG en terapia humana, se debería estudiar el comportamiento de estas células en primates no-humanos, y para ello se debería responder a cuatro preguntas básicas: i) ¿sería el BO una fuente apropiada de OEG para terapia celular en primates?, ii) ¿se podría obtener a partir de un solo BO de primate un número de células suficiente para poder realizar auto- o alo-trasplantes, tanto en estado agudo como crónico de la lesión?, iii) ¿Se podría congelar la OEG para poder ser almacenada sin sufrir ningún cambio fenotípico?, y iv) ¿ofrece la OEG una herramienta terapéutica segura para poder trasladarla a la clínica?. La respuesta afirmativa a todas estas preguntas parece crucial antes de llevar a cabo estudios pre-clínicos en monos o de aplicar esta terapia en humanos. Por lo tanto, uno de los objetivos fundamentales en este trabajo ha sido el estudio de la OEG de primate *in vitro* en comparación con la de roedor (cuya eficiencia en trasplantes en ratas adultas ya ha sido demostrada), para poder acercarnos un poco más a la utilización clínica de estas células.

Se sabe que la mayoría de las células somáticas de mamífero se dividen un número limitado de veces en cultivo y después entran en senescencia replicativa (Hayflick, 1965). Aunque resultó posible la puesta en cultivo de la OEG de bulbos olfatorios tanto de roedor como de primate, las células de las dos especies mostraron una diferente capacidad de crecimiento, así como diferente expresión de los marcadores de senescencia. Esto no es de extrañar puesto que el número de veces que una célula se divide antes de su entrada en senescencia varía enormemente dependiendo del tipo celular, del organismo de origen (Hayflick, 1965; Martin *et al.*, 1970; Rohme, 1981), y la sensibilidad de ese tipo celular al entorno artificial *ex vivo* (Sherr y DePinho, 2000; Parrinello *et al.*, 2003).

En base a la tasa de división y a la presencia de actividad SA- $\beta$ -Gal (Dimri *et al.*, 1995, Bodnar *et al.*, 1998), podemos concluir que la OEG de roedor se encuentra en estado pre-senescente inmediatamente después de su puesta en cultivo. Estas células empezaron dividiéndose a una tasa de 1 duplicación poblacional (DP) por semana, lo que corresponde a un estado presenescente según los criterios establecidos (Bodnar *et al.*, 1998), y presentaron actividad  $\beta$ -

Galactosidasa asociada a senescencia intensa desde el momento de la siembra. Sin embargo, hasta la tercera semana no comenzaron a adquirir un fenotipo senescente (caracterizado por un aumento en el tamaño del citoplasma, pérdida de las prolongaciones y aspecto más aplanado) ni a perder sus propiedades inmunocitoquímicas. Estas células entraron en "crisis" tras la quinta semana *in vitro*, es decir, dejaron de dividirse entrando en estado senescente (menos de una DP en dos semanas) y, tras un mes en este estado, algunos cultivos murieron y otros se immortalizaron espontáneamente. Esta última condición es muy frecuente en células de roedores tras su estado de senescencia (Shimizu *et al.*, 2003) y ya ha sido previamente descrita en OEG de rata (Sonigra *et al.*, 1996). En este trabajo mostramos cómo estas células perdieron la inhibición por contacto y mantuvieron las propiedades asociadas a senescencia, lo que convirtió a la OEG immortalizada en células no aptas para ser trasplantadas. En comparación con la de roedor, y en base a su tasa de división (superior a 2 DPs/semana) y a la ausencia de actividad  $\beta$ -Galactosidasa asociada a senescencia, la OEG de primate resultó ser no-senescente tras su siembra, y se dividió *in vitro* durante al menos cuatro meses. Tras su segundo mes en cultivo, las células mostraban una morfología similar a la de los cultivos jóvenes de roedor (de menos de dos semanas *in vitro*), y a partir de ese momento entraron en estado pre-senescente. Estas células entraron en senescencia tras el cuarto mes en cultivo, pero a diferencia de las de roedor, no dejaron de dividirse por completo ni tampoco se immortalizaron durante el periodo de estudio.

Estas diferencias en el crecimiento de la OEG y en su comportamiento *in vitro* dependientes de especie son similares a las que presentan los fibroblastos en otros trabajos (Steinert *et al.*, 2002; Parrinello *et al.*, 2003; Shimizu *et al.*, 2003). En el trabajo de Parrinello en concreto, los fibroblastos murinos mantenidos en cultivo bajo condiciones estándar, mostraron una cinética muy similar a la de nuestras células, immortalizándose también tras permanecer durante algún tiempo en estado senescente (Parrinello *et al.*, 2003). Sin embargo, los fibroblastos humanos tardan más tiempo en entrar en senescencia y no presentan ningún signo de immortalización espontánea.

Por otro lado, en condiciones de cultivo estándar, las células permanecen expuestas a cierto grado de estrés oxidativo, ya que la concentración de oxígeno

en los incubadores utilizados habitualmente es del 20% mientras que las células *in vivo* se exponen a concentraciones de 2-5% de oxígeno. Trabajos previos han demostrado que el estrés oxidativo actúa como estimulador de la entrada en senescencia de forma más eficiente en el caso de fibroblastos de roedor que en fibroblastos humanos (Balin *et al.*, 1984; Saito *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1995; Saito *et al.*, 1995; Parrinello *et al.*, 2003). En nuestro estudio, la OEG de roedor muestra una sensibilidad al estrés oxidativo similar a la de otras células de roedor (Parrinello *et al.*, 2003) mientras que la OEG de primate no experimenta cambios cuando se cultiva en condiciones de bajo oxígeno, demostrando por tanto, que la OEG de roedor es más sensible al estrés oxidativo que la OEG de primate no humano.

La vida media de la OEG de roedor fue diferente a la de otros tipos de glía envolvente como las células de Schwann y los oligodendrocitos. Los dos tipos celulares han demostrado carecer de senescencia replicativa y pueden proliferar en cultivo indefinidamente (Eccleston *et al.*, 1991; Tang *et al.*, 2001), lo cual apoya la exclusividad de la OEG como un tipo independiente de célula glial (Ramon-Cueto y Valverde, 1995; Wewetzer *et al.*, 2002). En conclusión, la OEG de roedor y de primate desarrollan un comportamiento diferente en cuanto a su crecimiento *in vitro*, su vida media y la sensibilidad al estrés, y las células de primate entran en senescencia tras largos periodos en cultivo.

Según nuestros resultados, la pérdida de expresión de p75 en los cultivos de OEG parece predecir, de algún modo, su entrada en senescencia. En roedores, el número de OEG p75-positiva disminuyó a partir de la tercera semana en cultivo (dos semanas antes de la entrada en senescencia), coincidiendo con la adquisición de una apariencia senescente y la disminución en la tasa de división. En monos, la intensidad de p75 disminuyó cuando las células entraron en un estado pre-senescente (a partir de dos meses y medio en cultivo), aunque dicha expresión se mantuvo en casi todas las células durante todo el periodo en cultivo. Del mismo modo, la OEG de mono nunca dejó de dividirse por completo. En las células de Schwann, el receptor de neurotrofinas p75 ha sido involucrado en la vía de apoptosis NGF (Petratos *et al.*, 2003) y en la inhibición del crecimiento por el Factor 1 de las células de Schwann (Chittka *et al.*, 2004), pero también se ha relacionado con migración y mielinización vía BDNF y NT3 (Yamauchi *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2005). En la OEG, este receptor se expresa cuando las células se encuentran en

estado no-senescente y se están dividiendo activamente, y desaparece cuando los cultivos entran en senescencia y dejan de dividirse. En el caso de la OEG creemos que p75 podría estar mediando una función positiva por varios motivos. De hecho, sólo la OEG p75 positiva es capaz de envolver neuritas *in vitro* (Ramon-Cueto *et al.*, 1993) y, por lo tanto, este receptor podría jugar un papel importante en la función de envolver los axones. En cuanto a su relación con la migración de la OEG se necesitaría una mayor investigación y una demostración directa. Nosotros creemos que la disminución y desaparición de p75 en la OEG podría ser un signo temprano de los cambios fenotípicos asociados a senescencia que normalmente ocurren en todas las células (Vacanti *et al.*, 2005), y que podría ser utilizado como marcador para distinguir el estado senescente de la OEG. Puesto que la pérdida de p75 y la entrada en senescencia de la OEG podrían cambiar las propiedades funcionales de estas células, en el caso de roedores, sería recomendable la utilización de cultivos tempranos (menos de tres semanas) de OEG p75 positiva para estudios en los que se realice trasplante. Esto garantizaría una mayor supervivencia de las células una vez trasplantadas, y el mantenimiento de sus propiedades como células promotoras de crecimiento. En el caso de los primates esta ventana temporal es bastante más larga (véase más abajo).

#### **IX. Un solo bulbo olfatorio de primate proporciona células suficientes y fiables para su uso en terapia y su almacenaje.**

La OEG de bulbos olfatorios de primate parece ser buena candidata para ser trasplantada en el SNC. Durante más de dos meses, estas células están en estado no-senescente y son similares morfológica e inmunocitoquímicamente a la OEG presenescente p75-positiva de roedor (la que encontramos inmediatamente después de la siembra), que es la que hemos utilizado de forma habitual para promover la regeneración axonal en nuestros experimentos previos (revisado en Santos-Benito y Ramon-Cueto, 2003). Estas células de primate no empiezan a presentar una tasa de división típica de células pre-senescentes hasta transcurridos más de dos meses en cultivo. Además la OEG de primate expresó p75 durante todo el periodo en cultivo y, como hemos mencionado anteriormente, la presencia de esta molécula parece ser relevante para envolver axones (Ramon-Cueto *et al.*, 1993). Con todo esto, la OEG de primate parece ser mejor para trasplantes que la

de roedores. En primer lugar, la mayoría de la OEG presente en los cultivos primarios de bulbo olfatorio de primate, y tan solo el 35% de la OEG de rata fue inmunoreactiva para p75 bajo las mismas condiciones (Ramon-Cueto y Nieto-Sampedro, 1992). Este porcentaje superior de células p75 y su persistencia durante más de dos meses constituye una ventaja en los cultivos de OEG de mono, puesto que la purificación de la OEG-p75 previa a los trasplantes no parece ser necesaria en primates y esto simplifica mucho el método de preparación de las células para trasplante. En segundo lugar, los cultivos de OEG de mono no son senescentes y preservan sus propiedades durante más de dos meses, entrando en senescencia a partir del tercer mes. Esto ofrece una mayor ventana temporal para poder obtener grandes cantidades de células fiables para ser trasplantadas. De hecho, en monos adultos, un solo bulbo olfatorio proporciona, en dos meses y medio,  $2,5 \times 10^{10}$  células no-senescentes, que son más que suficientes para trasplante autólogo y heterólogo y también para su almacenaje y uso futuro. Además, en el caso de tratamiento en la fase aguda de la lesión, queda garantizada la obtención de  $1,5 \times 10^6$  OEG a partir de un solo bulbo olfatorio de primate en tan solo 10 días *in vitro*, siendo suficiente en ese caso, con tan solo  $10^6$  células para trasplantar un animal (500.000 células/muñón) si extrapolamos los números de los estudios con roedores. En tercer lugar, la manipulación de la OEG de primate resulta más sencilla ya que estas células no resultaron ser sensibles a las concentraciones de oxígeno atmosférico, y por lo tanto, se pueden utilizar incubadores estándar para su expansión *in vitro*. Además, las propiedades *in vitro* y la cinética de crecimiento de la OEG de primate no se vieron alteradas tras el proceso de congelación-descongelación, lo cual permite la posibilidad de su almacenaje en bancos de células para su uso futuro. Se ha demostrado que la OEG proveniente de bulbos olfatorios caninos y de roedor, y que había sido criopreservada mantuvo su capacidad reparadora después de ser trasplantada. Estas células fueron capaces de remielinizar axones en la médula espinal (Smith *et al.*, 2002) y promovieron con éxito la regeneración axonal y la recuperación de la actividad de la vejiga tras una rizotomía dorsal bilateral a nivel lumbosacro (Pascual *et al.*, 2002).

Los bulbos olfatorios de primate constituyen una buena fuente de OEG con fines terapéuticos. En primates, el bulbo olfatorio presenta un fácil acceso (véase métodos), y no se observaron efectos secundarios ni asimetrías en el cerebro en los



monos bulbectomizados (no se muestra). Aunque la OEG se puede obtener también a partir de epitelio nasal (Lu *et al.*, 2001; Ramer *et al.*, 2004), la utilización de bulbos olfatorios como fuente de OEG ofrece ciertas ventajas. En comparación con el epitelio, como se mencionó anteriormente, el bulbo olfatorio es un tejido aséptico disminuyendo por tanto el riesgo de introducir infecciones con el trasplante en el SNC. Además todavía no existe ningún método que permita separar las células de Schwann de los cultivos de epitelio nasal, por lo que estos cultivos contienen una mezcla de OEG y células de Schwann. Como ya se describió en la introducción, las células de Schwann provocan una reactividad astrocítica muy superior y con mayor expresión de moléculas inhibitoras que la OEG, además no se mezclan bien con los astrocitos, presentando mayor dificultad para migrar en el SNC (Ramon-Cueto *et al.*, 1998; Ramon-Cueto *et al.*, 2000; Lakatos *et al.*, 2000; Lakatos *et al.*, 2003; Barnett y Riddell, 2004). Parece lógico que la OEG de bulbo olfatorio se mueva con mayor facilidad en el interior de la médula espinal, puesto que su medio natural es el SNC a diferencia de la OEG epitelial (SNP). En un estudio llevado a cabo en humanos, el trasplante de OEG epitelial en personas con la médula espinal lesionada no causó efectos secundarios tras 12 meses, pero estos pacientes tampoco han presentado todavía ningún signo de recuperación funcional (Feron *et al.*, 2005). Las razones de esta falta de resultados positivos pueden encontrarse en la presencia de células de Schwann en los trasplantes, que ocasionarían una mayor reactividad glial y presumiblemente una mayor dificultad para el paso de axones distalmente (Lakatos *et al.*, 2000; Lakatos *et al.*, 2003; Barnett y Riddell, 2004). Un trabajo reciente que apoya esta teoría es el llevado a cabo por Lu y colaboradores [Lu, 2006 #854], en el que demuestran que los trasplantes de OEG proveniente del epitelio olfatorio no presentan una migración significativa en comparación con otros tipos celulares trasplantados. Así mismo, estos trasplantes tampoco promovieron regeneración axonal significativa. Puesto que los autores no proponen ningún método para purificar la OEG periférica de las células de Schwann, un importante número de estas fue trasplantado en dicho estudio junto con la OEG, pudiendo ser dichas células las causantes de la ausencia de migración por su incapacidad para mezclarse con los astrocitos del SNC, y las causantes de la ausencia de regeneración axonal por la mayor reacción astrocítica y expresión de moléculas inhibitoras que provocan.

Puesto que un mismo tipo celular se puede comportar de diferente manera dependiendo de la especie a la que pertenece (Hayflick, 1965; Martin *et al.*, 1970; Rohme, 1981), nos parece de vital importancia el estudio de una determinada terapia celular en otros primates antes de que sea utilizada en clínica humana. Y para ello, uno de los objetivos fundamentales de este trabajo ha sido el estudio *in vitro* de la OEG de primate no-humano, por su mayor proximidad filogenética a los humanos, y su comparación con la de roedor, cuya capacidad promotora de la regeneración ya ha sido demostrada. En este trabajo se han presentado evidencias que muestran por primera vez, que la OEG se puede obtener a partir de bulbos olfatorios de primates adultos mediante bulbectomías unilaterales, y que un solo bulbo olfatorio proporciona suficiente OEG fenotípicamente adecuada para una terapia celular segura, mediante trasplantes autólogos o heterólogos en primates. El siguiente paso en este terreno será la prueba de la seguridad que ofrece la utilización de estas células (su inocuidad) y de su eficacia en la reparación de médulas espinales lesionadas de primates no-humanos. Esto podrá determinar lo cerca que nos encontramos de poder utilizar esta terapia en humanos de forma segura.



## CONCLUSIONES

## **Conclusiones**

---

1. Los trasplantes de glía envolvente olfatoria (OEG) adulta promueven la recuperación funcional de ratas parapléjicas y la regeneración axonal en sus médulas espinales cuando es trasplantada tanto en la fase subaguda como en la fase crónica de la lesión medular. Estos trasplantes en médulas espinales completamente seccionadas de ratas adultas se pueden retrasar con éxito hasta 4 meses después de la lesión.
2. El poder retrasar el trasplante de OEG al menos 4 meses, permite disponer del tiempo suficiente para obtener los bulbos, cultivar, expandir y preparar las células en el caso de que se realicen trasplantes autólogos. Por lo tanto, la realización de trasplantes autólogos de OEG parece constituir una terapia viable.
3. La OEG adulta promueve la regeneración axonal de neuronas del tronco del encéfalo implicadas en el establecimiento de la función motora a través de la zona de la lesión, y en el interior del muñón caudal, cuando se trasplanta 1 y 4 meses después de la lesión (fase subaguda y crónica).
4. No existen diferencias en el grado de recuperación funcional y de reparación histológica cuando la OEG es trasplantada en la fase aguda, subaguda y crónica de la lesión, y la eficacia de la OEG se mantiene independientemente de la fase del proceso inflamatorio, cicatricial y degenerativo en el que se encuentre el tejido medular lesionado.
5. La OEG es capaz de provocar una respuesta regenerativa en las neuronas tras cuatro meses de haber recibido una lesión por axotomía. Esto indica que las neuronas lesionadas conservan la capacidad de responder a estrategias promotoras del crecimiento axonal, lo que permite un periodo de actuación sobre las mismas, con ésta u otras estrategias, de hasta 4 meses.
6. Las neuronas del núcleo rojo, la formación reticular, el rafe, el locus coeruleus y el núcleo vestibular parecen estar implicadas en la recuperación funcional observada en las ratas parapléjicas, ya que el número de estas neuronas que

## Conclusiones

---

- regeneran su axón a través de la lesión correlaciona positivamente con dicha recuperación.
7. La OEG trasplantada 1 y 4 meses después de la sección completa de la médula espinal, promueve la preservación y/o la neoformación tisular en la zona de la lesión, disminuyendo la degeneración secundaria que se produce después de la misma.
  8. Existe una correlación lineal entre el volumen de degeneración secundaria y la recuperación funcional observada, de modo que un menor volumen de degeneración se corresponde con un mayor grado de recuperación funcional.
  9. La estabilización de la columna vertebral en ratas parapléjicas adultas, mediante puentes de cemento dental, es una técnica inocua, que disminuye el número de animales con escoliosis, y promueve una discreta recuperación funcional espontánea.
  10. La OEG promueve una recuperación funcional e histológica muy superior a la observada por la simple estabilización de la columna.
  11. La OEG de rata se encuentra en estado presenescente desde el momento de su siembra, comienza a cambiar su fenotipo a partir de la tercera semana *in vitro*, entra en senescencia tras 5 semanas y un mes después se inmortaliza, y forma focos en la placa. Estas células experimentan cambios fenotípicos asociados a senescencia a partir de la tercera semana *in vitro*, por lo que en los estudios de trasplantes y de caracterización molecular debería utilizarse OEG de rata que llevase menos de tres semanas en cultivo.
  12. La OEG de bulbos olfatorios de monos adultos no es presenescente, no entra en senescencia ni presenta cambios fenotípicos asociados a ésta durante al menos 2,5 meses en cultivo (que es cuando se hace presenescente), presentando una vida media larga. Por lo que en primates los cultivos de largo

## **Conclusiones**

---

plazo de OEG constituyen una fuente fiable de células para trasplante y para otros estudios.

13. De un bulbo olfatorio de primate adulto se pueden obtener, tras 10 días *in vitro*,  $1,5 - 2 \times 10^6$  células y tras 2,5 meses más de  $2,5 \times 10^{10}$  células no-senescentes. Esta cantidad es suficiente para realizar trasplantes autólogos y heterólogos, tanto en la fase aguda como en la crónica.
14. El proceso de congelación/descongelación no afecta ni a la capacidad de división, ni a las propiedades fenotípicas de la OEG de rata y de mono, lo que permitiría su almacenamiento en bancos de células.
15. En definitiva, la OEG de bulbos olfatorios de primates adultos constituye una buena fuente de células (mejor que la OEG de roedor) para ser usada en terapia mediante trasplante. Las propiedades y fácil manejo *in vitro* de la OEG de primate hacen que la terapia autóloga con estas células sea una aproximación viable, lo que abre una posibilidad futura para el uso de la OEG en clínica.





## **BIBLIOGRAFÍA**

- Ahn, Y.H., Lee, G., and Kang, S.K. (2006) Molecular insights of the injured lesions of rat spinal cords: Inflammation, apoptosis, and cell survival. *Biochem Biophys Res Commun* **348**: 560-570.
- Amano, M., Fukata, Y., and Kaibuchi, K. (2000) Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res* **261**: 44-51.
- Angello, J.C., Pendergrass, W.R., Norwood, T.H., and Prothero, J. (1989) Cell enlargement: one possible mechanism underlying cellular senescence. *J Cell Physiol* **140**: 288-294.
- Anthes, D.L., Theriault, E., and Tator, C.H. (1995) Characterization of axonal ultrastructural pathology following experimental spinal cord compression injury. *Brain Res* **702**: 1-16.
- Antri, M., Orsal, D., and Barthe, J.Y. (2002) Locomotor recovery in the chronic spinal rat: effects of long-term treatment with a 5-HT<sub>2</sub> agonist. *Eur J Neurosci* **16**: 467-476.
- Balin, A.K., Fisher, A.J., and Carter, D.M. (1984) Oxygen modulates growth of human cells at physiologic partial pressures. *J Exp Med* **160**: 152-166.
- Ballermann, M., and Fouad, K. (2006) Spontaneous locomotor recovery in spinal cord injured rats is accompanied by anatomical plasticity of reticulospinal fibers. *Eur J Neurosci* **23**: 1988-1996.
- Barakat, D.J., Gaglani, S.M., Neravetla, S.R., Sanchez, A.R., Andrade, C.M., Pressman, Y., Puzis, R., Garg, M.S., Bunge, M.B., and Pearce, D.D. (2005) Survival, integration, and axon growth support of glia transplanted into the chronically contused spinal cord. *Cell Transplant* **14**: 225-240.
- Barber, P.C. (1982) Neurogenesis and regeneration in the primary olfactory pathway of mammals. *Bibl Anat*: 12-25.
- Barber, P.C., and Lindsay, R.M. (1982) Schwann cells of the olfactory nerves contain glial fibrillary acidic protein and resemble astrocytes. *Neuroscience* **7**: 3077-3090.
- Bareyre, F.M., Kerschensteiner, M., Raineteau, O., Mettenleiter, T.C., Weinmann, O., and Schwab, M.E. (2004) The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. *Nat Neurosci* **7**: 269-277.
- Barnett, S.C., Alexander, C.L., Iwashita, Y., Gilson, J.M., Crowther, J., Clark, L., Dunn, L.T., Papanastassiou, V., Kennedy, P.G., Franklin, R.J., and 20368195 (2000)

- Identification of a human olfactory ensheathing cell that can effect transplant-mediated remyelination of demyelinated CNS axons. *Brain* **123**: 1581-1588.
- Barnett, S.C., and Riddell, J.S. (2004) Olfactory ensheathing cells (OECs) and the treatment of CNS injury: advantages and possible caveats. *J Anat* **204**: 57-67.
- Barrios, C., Tunon, M.T., De Salis, J.A., Beguiristain, J.L., and Canadell, J. (1987) Scoliosis induced by medullary damage: an experimental study in rabbits. *Spine* **12**: 433-439.
- Bartholdi, D., and Schwab, M.E. (1997) Expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse: an in situ hybridization study. *Eur J Neurosci* **9**: 1422-1438.
- Basso, D.M., Beattie, M.S., and Bresnahan, J.C. (1995) A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* **12**: 1-21.
- Basso, D.M., Beattie, M.S., and Bresnahan, J.C. (1996) Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol* **139**: 244-256.
- Beattie, M.S., Bresnahan, J.C., Komon, J., Tovar, C.A., Van Meter, M., Anderson, D.K., Faden, A.I., Hsu, C.Y., Noble, L.J., Salzman, S., and Young, W. (1997) Endogenous repair after spinal cord contusion injuries in the rat. *Exp Neurol* **148**: 453-463.
- Beattie, M.S., Hermann, G.E., Rogers, R.C., and Bresnahan, J.C. (2002) Cell death in models of spinal cord injury. *Prog Brain Res* **137**: 37-47.
- Benn, P.A. (1976) Specific chromosome aberrations in senescent fibroblast cell lines derived from human embryos. *Am J Hum Genet* **28**: 465-473.
- Blanes, T. (1898) Sobre algunos puntos dudosos de la estructura del bulbo olfatorio. *Rev. Trim. Micrograf.* **3**: 99-127.
- Blesch, A., Yang, H., Weidner, N., Hoang, A., and Otero, D. (2004) Axonal responses to cellularly delivered NT-4/5 after spinal cord injury. *Mol Cell Neurosci* **27**: 190-201.
- Blight, A. (1988) Mechanical factors in experimental spinal cord injury. *J Am Paraplegia Soc* **11**: 26-34.

- Blight, A.R. (1985) Delayed demyelination and macrophage invasion: a candidate for secondary cell damage in spinal cord injury. *Cent Nerv Syst Trauma* **2**: 299-315.
- Blits, B., Dijkhuizen, P.A., Boer, G.J., and Verhaagen, J. (2000) Intercostal nerve implants transduced with an adenoviral vector encoding neurotrophin-3 promote regrowth of injured rat corticospinal tract fibers and improve hindlimb function. *Exp Neurol* **164**: 25-37.
- Bochelen, D., Eclancher, F., Kupferberg, A., Privat, A., and Mersel, M. (1992) 7 beta-hydroxycholesterol and 7 beta-hydroxycholesteryl-3-esters reduce the extent of reactive gliosis caused by an electrolytic lesion in rat brain. *Neuroscience* **51**: 827-834.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., Wright, W.E., and 98113956 (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**: 349-352.
- Bomstein, Y., Marder, J.B., Vitner, K., Smirnov, I., Lisaey, G., Butovsky, O., Fulga, V., and Yoles, E. (2003) Features of skin-coincubated macrophages that promote recovery from spinal cord injury. *J Neuroimmunol* **142**: 10-16.
- Bomze, H.M., Bulsara, K.R., Iskandar, B.J., Caroni, P., and Skene, J.H. (2001) Spinal axon regeneration evoked by replacing two growth cone proteins in adult neurons. *Nat Neurosci* **4**: 38-43.
- Bortoff, G.A., and Strick, P.L. (1993) Corticospinal terminations in two new-world primates: further evidence that corticomotoneuronal connections provide part of the neural substrate for manual dexterity. *J Neurosci* **13**: 5105-5118.
- Boruch, A.V., Connors, J.J., Pipitone, M., Deadwyler, G., Storer, P.D., Devries, G.H., and Jones, K.J. (2001) Neurotrophic and migratory properties of an olfactory ensheathing cell line. *Glia* **33**: 225-229.
- Bovolenta, P., Feraud-Espinosa, I., Mendez-Otero, R., and Nieto-Sampedro, M. (1997) Neurite outgrowth inhibitor of gliotic brain tissue. Mode of action and cellular localization, studied with specific monoclonal antibodies. *Eur J Neurosci* **9**: 977-989.

- Bradbury, E.J., Khemani, S., Von, R., King, Priestley, J.V., and McMahon, S.B. (1999) NT-3 promotes growth of lesioned adult rat sensory axons ascending in the dorsal columns of the spinal cord. *Eur J Neurosci* **11**: 3873-3883.
- Bradbury, E.J., Moon, L.D., Popat, R.J., King, V.R., Bennett, G.S., Patel, P.N., Fawcett, J.W., and McMahon, S.B. (2002) Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* **416**: 636-640.
- Bregman, B.S., Kunkel-Bagden, E., Schnell, L., Dai, H.N., Gao, D., and Schwab, M.E. (1995) Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature* **378**: 498-501.
- Brook, G.A., Houweling, D.A., Gieling, R.G., Hermanns, T., Joosten, E.A., Bar, D.P., Gispén, W.H., Schmitt, A.B., LePrince, P., Noth, J., and Nacimient, W. (2000) Attempted endogenous tissue repair following experimental spinal cord injury in the rat: involvement of cell adhesion molecules L1 and NCAM? *Eur J Neurosci* **12**: 3224-3238.
- Brustle, O., Jones, K.N., Learish, R.D., Karram, K., Choudhary, K., Wiestler, O.D., Duncan, I.D., and McKay, R.D. (1999) Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* **285**: 754-756.
- Bunge, M.B., and Pearse, D.D. (2003) Transplantation strategies to promote repair of the injured spinal cord. *J Rehabil Res Dev* **40**: 55-62.
- Bush, T.G., Puvanachandra, N., Horner, C.H., Polito, A., Ostenfeld, T., Svendsen, C.N., Mucke, L., Johnson, M.H., and Sofroniew, M.V. (1999) Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* **23**: 297-308.
- Cahi, E., Rosen, M., and Becker, P.J. (1996) A comparison of the dimensional stability of three inlay pattern materials. *J Dent Assoc S Afr* **51**: 337-342.
- Cao, L., Liu, L., Chen, Z.Y., Wang, L.M., Ye, J.L., Qiu, H.Y., Lu, C.L., and He, C. (2004) Olfactory ensheathing cells genetically modified to secrete GDNF to promote spinal cord repair. *Brain* **127**: 535-549.
- Cao, Q., Xu, X.M., Devries, W.H., Enzmann, G.U., Ping, P., Tsoulfas, P., Wood, P.M., Bunge, M.B., and Whittemore, S.R. (2005) Functional recovery in traumatic spinal cord injury after transplantation of multilineurotrophin-expressing glial-restricted precursor cells. *J Neurosci* **25**: 6947-6957.

- Caroni, P., Savio, T., and Schwab, M.E. (1988) Central nervous system regeneration: oligodendrocytes and myelin as non-permissive substrates for neurite growth. *Prog Brain Res* **78**: 363-370.
- Caroni, P., and Schwab, M.E. (1988a) Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J Cell Biol* **106**: 1281-1288.
- Caroni, P., and Schwab, M.E. (1988b) Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* **1**: 85-96.
- Carulli, D., Laabs, T., Geller, H.M., and Fawcett, J.W. (2005) Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and regeneration. *Curr Opin Neurobiol* **15**: 116-120.
- Chan, C.C., Khodarahmi, K., Liu, J., Sutherland, D., Oschipok, L.W., Steeves, J.D., and Tetzlaff, W. (2005) Dose-dependent beneficial and detrimental effects of ROCK inhibitor Y27632 on axonal sprouting and functional recovery after rat spinal cord injury. *Exp Neurol* **196**: 352-364.
- Chen, M.S., Huber, A.B., van der Haar, M.E., Frank, M., Schnell, L., Spillmann, A.A., Christ, F., and Schwab, M.E. (2000) Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* **403**: 434-439.
- Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J.D., Yan, L.J., and Ames, B.N. (1995) Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 4337-4341.
- Cheng, B., Christakos, S., and Mattson, M.P. (1994) Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron* **12**: 139-153.
- Cheng, H., and Olson, L. (1995) A new surgical technique that allows proximodistal regeneration of 5-HT fibers after complete transection of the rat spinal cord. *Exp Neurol* **136**: 149-161.
- Chittka, A., Arevalo, J.C., Rodriguez-Guzman, M., Perez, P., Chao, M.V., and Sendtner, M. (2004) The p75NTR-interacting protein SC1 inhibits cell cycle progression by transcriptional repression of cyclin E. *J Cell Biol* **164**: 985-996.

- Chuah, M.I., and Au, C. (1991) Olfactory Schwann cells are derived from precursor cells in the olfactory epithelium. *J Neurosci Res* **29**: 172-180.
- Chuah, M.I., and West, A.K. (2002) Cellular and molecular biology of ensheathing cells. *Microsc Res Tech* **58**: 216-227.
- Chung, R.S., Woodhouse, A., Fung, S., Dickson, T.C., West, A.K., Vickers, J.C., and Chuah, M.I. (2004) Olfactory ensheathing cells promote neurite sprouting of injured axons in vitro by direct cellular contact and secretion of soluble factors. *Cell Mol Life Sci* **61**: 1238-1245.
- Clarac, F., Vinay, L., Cazalets, J.R., Fady, J.C., and Jamon, M. (1998) Role of gravity in the development of posture and locomotion in the neonatal rat. *Brain Res Brain Res Rev* **28**: 35-43.
- Coumans, J.V., Lin, T.T., Dai, H.N., MacArthur, L., McAtee, M., Nash, C., and Bregman, B.S. (2001) Axonal regeneration and functional recovery after complete spinal cord transection in rats by delayed treatment with transplants and neurotrophins. *J Neurosci* **21**: 9334-9344.
- Courtine, G., Roy, R.R., Raven, J., Hodgson, J., McKay, H., Yang, H., Zhong, H., Tuszynski, M.H., and Edgerton, V.R. (2005) Performance of locomotion and foot grasping following a unilateral thoracic corticospinal tract lesion in monkeys (*Macaca mulatta*). *Brain* **128**: 2338-2358.
- Courtine G, B.M., Edgerton R, Fawcett J, Grossman H, Kass J, Lemon R, Maler I, Martin J, Nudo R, Ramón-Cueto A, Rouiller E, Schnell L, Schwab M, and Wannier T. (2006) Can Non-human Primate Experiments Expedite Translation of Potential Regenerative Interventions Following Spinal Cord Injury to Humans. *Nature Medicine*: in press.
- Crowe, M.J., Bresnahan, J.C., Shuman, S.L., Masters, J.N., and Beattie, M.S. (1997) Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med* **3**: 73-76.
- David, S., and Aguayo, A.J. (1981) Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science* **214**: 931-933.
- David, S., Bouchard, C., Tsatas, O., and Giftochristos, N. (1990) Macrophages can modify the nonpermissive nature of the adult mammalian central nervous system. *Neuron* **5**: 463-469.

- Davies, S.J., Fitch, M.T., Memberg, S.P., Hall, A.K., Raisman, G., and Silver, J. (1997) Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. *Nature* **390**: 680-683.
- De Felipe, J., Jones, E.G. (1991) *Cajal's degeneration and regeneration of the nervous system*. New York: Oxford University Press and Fidia Research foundation.
- de Medinaceli, L., and Wyatt, R.J. (1993) A method for shortening of the rat spine and its neurologic consequences. *J Neural Transplant Plast* **4**: 39-52.
- De Winter, F., Oudega, M., Lankhorst, A.J., Hamers, F.P., Blits, B., Ruitenberg, M.J., Pasterkamp, R.J., Gipsen, W.H., and Verhaagen, J. (2002) Injury-induced class 3 semaphorin expression in the rat spinal cord. *Exp Neurol* **175**: 61-75.
- Decherchi, P., and Gauthier, P. (2000) Regrowth of acute and chronic injured spinal pathways within supra-lesional post-traumatic nerve grafts. *Neuroscience* **101**: 197-210.
- DeLucia, T.A., Connors, J.J., Brown, T.J., Cronin, C.M., Khan, T., and Jones, K.J. (2003) Use of a cell line to investigate olfactory ensheathing cell-enhanced axonal regeneration. *Anat Rec* **271B**: 61-70.
- Dergham, P., Ellezam, B., Essagian, C., Avedissian, H., Lubell, W.D., and McKerracher, L. (2002) Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair. *J Neurosci* **22**: 6570-6577.
- Deumens, R., Koopmans, G.C., and Joosten, E.A. (2005) Regeneration of descending axon tracts after spinal cord injury. *Prog Neurobiol*.
- Deumens, R., Koopmans, G.C., Honig, W.M., Hamers, F.P., Maquet, V., Jerome, R., Steinbusch, H.W., and Joosten, E.A. (2006a) Olfactory ensheathing cells, olfactory nerve fibroblasts and biomatrices to promote long-distance axon regrowth and functional recovery in the dorsally hemisected adult rat spinal cord. *Exp Neurol* **200**: 89-103.
- Deumens, R., Koopmans, G.C., Honig, W.M., Maquet, V., Jerome, R., Steinbusch, H.W., and Joosten, E.A. (2006b) Chronically injured corticospinal axons do not cross large spinal lesion gaps after a multifactorial transplantation strategy using olfactory ensheathing cell/olfactory nerve fibroblast-biomatrix bridges. *J Neurosci Res* **83**: 811-820.



- Devon, R., and Doucette, R. (1992) Olfactory ensheathing cells myelinate dorsal root ganglion neurites. *Brain Res* **589**: 175-179.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., and et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 9363-9367.
- Doble, A. (1999) The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther* **81**: 163-221.
- Doucette, J.R., Kiernan, J.A., and Flumerfelt, B.A. (1983) The re-innervation of olfactory glomeruli following transection of primary olfactory axons in the central or peripheral nervous system. *J Anat* **137 (Pt 1)**: 1-19.
- Doucette, J.R. (1984) The glial cells in the nerve fiber layer of the rat olfactory bulb. *Anat Rec* **210**: 385-391.
- Doucette, R. (1990) Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system. *Glia* **3**: 433-449.
- Doucette, R. (1991) PNS-CNS transitional zone of the first cranial nerve. *J Comp Neurol* **312**: 451-466.
- Doucette, R. (1996) Immunohistochemical localization of laminin, fibronectin and collagen type IV in the nerve fiber layer of the olfactory bulb. *Int J Dev Neurosci* **14**: 945-959.
- Ducker, T.B., and Zeidman, S.M. (1994) Spinal cord injury. Role of steroid therapy. *Spine* **19**: 2281-2287.
- Dusart, I., Marty, S., and Peschanski, M. (1991) Glial changes following an excitotoxic lesion in the CNS-II. Astrocytes. *Neuroscience* **45**: 541-549.
- Dusart, I., and Schwab, M.E. (1994) Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* **6**: 712-724.
- Ebendal, T. (1992) Function and evolution in the NGF family and its receptors. *J Neurosci Res* **32**: 461-470.
- Eccleston, P.A., Mirsky, R., and Jessen, K.R. (1991) Spontaneous immortalisation of Schwann cells in culture: short-term cultured Schwann cells secrete growth inhibitory activity. *Development* **112**: 33-42.

- Eddleston, M., and Mucke, L. (1993) Molecular profile of reactive astrocytes-- implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* **54**: 15-36.
- Eng, L.F., Reier, P.J., and Houle, J.D. (1987) Astrocyte activation and fibrous gliosis: glial fibrillary acidic protein immunostaining of astrocytes following intraspinal cord grafting of fetal CNS tissue. *Prog Brain Res* **71**: 439-455.
- Faden, A.I. (1996) Pharmacological treatment of central nervous system trauma. *Pharmacol Toxicol* **78**: 12-17.
- Fairless, R., and Barnett, S.C. (2005) Olfactory ensheathing cells: their role in central nervous system repair. *Int J Biochem Cell Biol* **37**: 693-699.
- Faulkner, J.R., Herrmann, J.E., Woo, M.J., Tansey, K.E., Doan, N.B., and Sofroniew, M.V. (2004) Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci* **24**: 2143-2155.
- Fawcett, J.W., Housden, E., Smith-Thomas, L., and Meyer, R.L. (1989) The growth of axons in three-dimensional astrocyte cultures. *Dev Biol* **135**: 449-458.
- Fawcett, J.W., and Asher, R.A. (1999) The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* **49**: 377-391.
- Fehlings, M.G., and Tator, C.H. (1995) The relationships among the severity of spinal cord injury, residual neurological function, axon counts, and counts of retrogradely labeled neurons after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol* **132**: 220-228.
- Ferguson, I.A., Koide, T., and Rush, R.A. (2001) Stimulation of corticospinal tract regeneration in the chronically injured spinal cord. *Eur J Neurosci* **13**: 1059-1064.
- Fernandez, E., Pallini, R., Lauretti, L., Mercanti, D., Serra, A., and Calissano, P. (1993) Spinal cord transection in adult rats: effects of local infusion of nerve growth factor on the corticospinal tract axons. *Neurosurgery* **33**: 889-893.
- Feron, F., Perry, C., Cochrane, J., Licina, P., Nowitzke, A., Urquhart, S., Geraghty, T., and Mackay-Sim, A. (2005) Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury. *Brain* **128**: 2951-2960.
- Fitch, M.T., and Silver, J. (1997) Glial cell extracellular matrix: boundaries for axon growth in development and regeneration. *Cell Tissue Res* **290**: 379-384.
- Fouad, K., and Pearson, K. (2004) Restoring walking after spinal cord injury. *Prog Neurobiol* **73**: 107-126.

- Fouad, K., Schnell, L., Bunge, M.B., Schwab, M.E., Liebscher, T., and Pearce, D.D. (2005) Combining Schwann cell bridges and olfactory-ensheathing glia grafts with chondroitinase promotes locomotor recovery after complete transection of the spinal cord. *J Neurosci* **25**: 1169-1178.
- Fournier, A.E., GrandPre, T., and Strittmatter, S.M. (2001) Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* **409**: 341-346.
- Fournier, A.E., and Strittmatter, S.M. (2001) Repulsive factors and axon regeneration in the CNS. *Curr Opin Neurobiol* **11**: 89-94.
- Fournier, A.E., Takizawa, B.T., and Strittmatter, S.M. (2003) Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *J Neurosci* **23**: 1416-1423.
- Fraidakis, M.J., Spenger, C., and Olson, L. (2004) Partial recovery after treatment of chronic paraplegia in rat. *Exp Neurol* **188**: 33-42.
- Franceschini, I.A., and Barnett, S.C. (1996) Low-affinity NGF-receptor and E-N-CAM expression define two types of olfactory nerve ensheathing cells that share a common lineage. *Dev Biol* **173**: 327-343.
- Franklin, R.J., and Barnett, S.C. (1997) Do olfactory glia have advantages over Schwann cells for CNS repair? *J Neurosci Res* **50**: 665-672.
- Franklin, R.J., and Barnett, S.C. (2000) Olfactory ensheathing cells and CNS regeneration: the sweet smell of success? *Neuron* **28**: 15-18.
- Frisen, J., Haegerstrand, A., Fried, K., Piehl, F., Cullheim, S., and Risling, M. (1994) Adhesive/repulsive properties in the injured spinal cord: relation to myelin phagocytosis by invading macrophages. *Exp Neurol* **129**: 183-193.
- Gao, Y., Deng, K., Hou, J., Bryson, J.B., Barco, A., Nikulina, E., Spencer, T., Mellado, W., Kandel, E.R., and Filbin, M.T. (2004) Activated CREB is sufficient to overcome inhibitors in myelin and promote spinal axon regeneration in vivo. *Neuron* **44**: 609-621.
- Gates, M.A., Fillmore, H., and Steindler, D.A. (1996) Chondroitin sulfate proteoglycan and tenascin in the wounded adult mouse neostriatum in vitro: dopamine neuron attachment and process outgrowth. *J Neurosci* **16**: 8005-8018.
- Geller, H.M., and Fawcett, J.W. (2002) Building a bridge: engineering spinal cord repair. *Exp Neurol* **174**: 125-136.
- Gerin, C., and Privat, A. (1998) Direct evidence for the link between monoaminergic descending pathways and motor activity: II. A study with microdialysis

- probes implanted in the ventral horn of the spinal cord. *Brain Res* **794**: 169-173.
- Gimenez y Ribotta, M., Rajaofetra, N., Morin-Richaud, C., Alonso, G., Bochen, D., Sandillon, F., Legrand, A., Mersel, M., and Privat, A. (1995) Oxysterol (7 beta-hydroxycholesteryl-3-oleate) promotes serotonergic reinnervation in the lesioned rat spinal cord by reducing glial reaction. *J Neurosci Res* **41**: 79-95.
- Goldman, S.A., and Nedergaard, M. (2002) Erythropoietin strikes a new cord. *Nat Med* **8**: 785-787.
- Golgi, C. (1875) Sulla fina anatomia del bulbi olfactorii. *Reggio-Emilia*.
- GrandPre, T., Nakamura, F., Vartanian, T., and Strittmatter, S.M. (2000) Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* **403**: 439-444.
- GrandPre, T., Li, S., and Strittmatter, S.M. (2002) Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature* **417**: 547-551.
- Graziadei, P.P., and Graziadei, G.A. (1979) Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *J Neurocytol* **8**: 1-18.
- Graziadei, P.P., and Monti Graziadei, G.A. (1980) Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. III. Deafferentation and reinnervation of the olfactory bulb following section of the fila olfactoria in rat. *J Neurocytol* **9**: 145-162.
- Grill, R., Murai, K., Blesch, A., Gage, F.H., and Tuszynski, M.H. (1997a) Cellular delivery of neurotrophin-3 promotes corticospinal axonal growth and partial functional recovery after spinal cord injury. *J Neurosci* **17**: 5560-5572.
- Grill, R.J., Blesch, A., and Tuszynski, M.H. (1997b) Robust growth of chronically injured spinal cord axons induced by grafts of genetically modified NGF-secreting cells. *Exp Neurol* **148**: 444-452.
- Grimpe, B., and Silver, J. (2002) The extracellular matrix in axon regeneration. *Prog Brain Res* **137**: 333-349.
- Gruner, J.A. (1992) A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *J Neurotrauma* **9**: 123-126; discussion 126-128.

- Hagg, T., and Oudega, M. (2006) Degenerative and spontaneous regenerative processes after spinal cord injury. *J Neurotrauma* **23**: 263-280.
- Hall, E.D., and Springer, J.E. (2004) Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. *NeuroRx* **1**: 80-100.
- Hayflick, L. (1965) The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* **37**: 614-636.
- Hefti, F. (1997) Pharmacology of neurotrophic factors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**: 239-267.
- Hill, C.E., Beattie, M.S., and Bresnahan, J.C. (2001) Degeneration and sprouting of identified descending supraspinal axons after contusive spinal cord injury in the rat. *Exp Neurol* **171**: 153-169.
- Hinds, J.W. (1968) Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. I. Time of origin of neurons and neuroglia. *J Comp Neurol* **134**: 287-304.
- Hinds, J.W., Hinds, P.L., and McNelly, N.A. (1984) An autoradiographic study of the mouse olfactory epithelium: evidence for long-lived receptors. *Anat Rec* **210**: 375-383.
- Houle, J.D. (1991) Demonstration of the potential for chronically injured neurons to regenerate axons into intraspinal peripheral nerve grafts. *Exp Neurol* **113**: 1-9.
- Houle, J.D., and Jin, Y. (2001) Chronically injured supraspinal neurons exhibit only modest axonal dieback in response to a cervical hemisection lesion. *Exp Neurol* **169**: 208-217.
- Houle, J.D., and Tessler, A. (2003) Repair of chronic spinal cord injury. *Exp Neurol* **182**: 247-260.
- Huang, D.W., McKerracher, L., Braun, P.E., and David, S. (1999) A therapeutic vaccine approach to stimulate axon regeneration in the adult mammalian spinal cord. *Neuron* **24**: 639-647.
- Imaizumi, T., Lankford, K.L., Waxman, S.G., Greer, C.A., and Kocsis, J.D. (1998) Transplanted olfactory ensheathing cells remyelinate and enhance axonal conduction in the demyelinated dorsal columns of the rat spinal cord. *J Neurosci* **18**: 6176-6185.

- Imaizumi, T., Lankford, K.L., Burton, W.V., Fodor, W.L., and Kocsis, J.D. (2000a) Xenotransplantation of transgenic pig olfactory ensheathing cells promotes axonal regeneration in rat spinal cord. *Nat Biotechnol* **18**: 949-953.
- Imaizumi, T., Lankford, K.L., and Kocsis, J.D. (2000b) Transplantation of olfactory ensheathing cells or Schwann cells restores rapid and secure conduction across the transected spinal cord. *Brain Res* **854**: 70-78.
- Iwanami, A., Kaneko, S., Nakamura, M., Kanemura, Y., Mori, H., Kobayashi, S., Yamasaki, M., Momoshima, S., Ishii, H., Ando, K., Tanioka, Y., Tamaoki, N., Nomura, T., Toyama, Y., and Okano, H. (2005) Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. *J Neurosci Res* **80**: 182-190.
- Iwashita, Y., Crang, A.J., and Blakemore, W.F. (2000) Redistribution of bisbenzimidazole Hoechst 33342 from transplanted cells to host cells. *Neuroreport* **11**: 1013-1016.
- Jalink, K., van Corven, E.J., Hengeveld, T., Morii, N., Narumiya, S., and Moolenaar, W.H. (1994) Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *J Cell Biol* **126**: 801-810.
- Jeffery, N.D., and Blakemore, W.F. (1999) Spinal cord injury in small animals. 1. Mechanisms of spontaneous recovery. *Vet Rec* **144**: 407-413.
- Jin, Z., and Strittmatter, S.M. (1997) Rac1 mediates collapsin-1-induced growth cone collapse. *J Neurosci* **17**: 6256-6263.
- Jones, L.L., Oudega, M., Bunge, M.B., and Tuszynski, M.H. (2001) Neurotrophic factors, cellular bridges and gene therapy for spinal cord injury. *J Physiol* **533**: 83-89.
- Jones, L.L., and Tuszynski, M.H. (2002) Spinal cord injury elicits expression of keratan sulfate proteoglycans by macrophages, reactive microglia, and oligodendrocyte progenitors. *J Neurosci* **22**: 4611-4624.
- Jones, L.L., Yamaguchi, Y., Stallcup, W.B., and Tuszynski, M.H. (2002) NG2 is a major chondroitin sulfate proteoglycan produced after spinal cord injury and is expressed by macrophages and oligodendrocyte progenitors. *J Neurosci* **22**: 2792-2803.
- Joosten, E.A., Dijkstra, S., Brook, G.A., Veldman, H., and Bar, P.R. (2000) Collagen IV deposits do not prevent regrowing axons from penetrating the lesion site in spinal cord injury. *J Neurosci Res* **62**: 686-691.

- Kafitz, K.W., and Greer, C.A. (1999) Olfactory ensheathing cells promote neurite extension from embryonic olfactory receptor cells in vitro. *Glia* **25**: 99-110.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H. (1985) *Principles of neural science*. New York: Elsevier.
- Keane, R.W., Davis, A.R., and Dietrich, W.D. (2006) Inflammatory and apoptotic signaling after spinal cord injury. *J Neurotrauma* **23**: 335-344.
- Keyvan-Fouladi, N., Raisman, G., and Li, Y. (2003) Functional repair of the corticospinal tract by delayed transplantation of olfactory ensheathing cells in adult rats. *J Neurosci* **23**: 9428-9434.
- Keyvan-Fouladi, N., Raisman, G., and Li, Y. (2005) Delayed repair of corticospinal tract lesions as an assay for the effectiveness of transplantation of Schwann cells. *Glia* **51**: 306-311.
- Kirshblum, S., Campagnolo, D. I., DeLisa, J.A. (2002) *Spinal cord medicine*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Kitada, M., Chakraborty, S., Matsumoto, N., Taketomi, M., and Ide, C. (2001) Differentiation of choroid plexus ependymal cells into astrocytes after grafting into the pre-lesioned spinal cord in mice. *Glia* **36**: 364-374.
- Klusman, I., and Schwab, M.E. (1997) Effects of pro-inflammatory cytokines in experimental spinal cord injury. *Brain Res* **762**: 173-184.
- Kott, J.N., Westrum, L.E., Raines, E.W., Sasahara, M., and Ross, R. (1994) Olfactory ensheathing glia and platelet-derived growth factor B-chain reactivity in the transplanted rat olfactory bulb. *Int J Dev Neurosci* **12**: 315-323.
- Kreutzberg, G.W. (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* **19**: 312-318.
- Kwon, B.K., and Tetzlaff, W. (2001) Spinal cord regeneration: from gene to transplants. *Spine* **26**: S13-22.
- Kwon, B.K., Borisoff, J.F., and Tetzlaff, W. (2002a) Molecular targets for therapeutic intervention after spinal cord injury. *Mol Intervent* **2**: 244-258.
- Kwon, B.K., Liu, J., Messerer, C., Kobayashi, N.R., McGraw, J., Oschipok, L., and Tetzlaff, W. (2002b) Survival and regeneration of rubrospinal neurons 1 year after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 3246-3251.
- Kwon, B.K., Tetzlaff, W., Grauer, J.N., Beiner, J., and Vaccaro, A.R. (2004) Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J* **4**: 451-464.

- Laaris, N., Puche, A., and Ennis, M. (2007). Complementary postsynaptic activity patterns elicited in olfactory bulb by stimulation of mitral/tufted and centrifugal fiber inputs to granule cells. *J Neurophysiol* **97**(1): 296-306.
- Lakatos, A., Franklin, R.J., and Barnett, S.C. (2000) Olfactory ensheathing cells and Schwann cells differ in their in vitro interactions with astrocytes. *Glia* **32**: 214-225.
- Lakatos, A., Barnett, S.C., and Franklin, R.J. (2003) Olfactory ensheathing cells induce less host astrocyte response and chondroitin sulphate proteoglycan expression than Schwann cells following transplantation into adult CNS white matter. *Exp Neurol* **184**: 237-246.
- Lawrence, D.G., and Kuypers, H.G. (1968) The functional organization of the motor system in the monkey. I. The effects of bilateral pyramidal lesions. *Brain* **91**: 1-14.
- Le Douarin, N., Dulac, C., Dupin, E., and Cameron-Curry, P. (1991) Glial cell lineages in the neural crest. *Glia* **4**: 175-184.
- Lee, Y.S., Lin, C.Y., Robertson, R.T., Hsiao, I., and Lin, V.W. (2004) Motor recovery and anatomical evidence of axonal regrowth in spinal cord-repaired adult rats. *J Neuropathol Exp Neurol* **63**: 233-245.
- Letourneau, P.C. (1996) The cytoskeleton in nerve growth cone motility and axonal pathfinding. *Perspect Dev Neurobiol* **4**: 111-123.
- Levi-Montalcini, R. (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science* **237**: 1154-1162.
- Levine, J.M. (1994) Increased expression of the NG2 chondroitin-sulfate proteoglycan after brain injury. *J Neurosci* **14**: 4716-4730.
- Li, S., and Strittmatter, S.M. (2003) Delayed systemic Nogo-66 receptor antagonist promotes recovery from spinal cord injury. *J Neurosci* **23**: 4219-4227.
- Li, Y., and Raisman, G. (1994) Schwann cells induce sprouting in motor and sensory axons in the adult rat spinal cord. *J Neurosci* **14**: 4050-4063.
- Li, Y., Field, P.M., and Raisman, G. (1997) Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science* **277**: 2000-2002.
- Li, Y., Field, P.M., Raisman, G., and 99071321 (1998) Regeneration of adult rat corticospinal axons induced by transplanted olfactory ensheathing cells. *J Neurosci* **18**: 10514-10524.



- Li, Y., Decherchi, P., and Raisman, G. (2003a) Transplantation of olfactory ensheathing cells into spinal cord lesions restores breathing and climbing. *J Neurosci* **23**: 727-731.
- Li, Y., Sauve, Y., Li, D., Lund, R.D., and Raisman, G. (2003b) Transplanted olfactory ensheathing cells promote regeneration of cut adult rat optic nerve axons. *J Neurosci* **23**: 7783-7788.
- Liebscher, T., Schnell, L., Schnell, D., Scholl, J., Schneider, R., Gullo, M., Fouad, K., Mir, A., Rausch, M., Kindler, D., Hamers, F.P., and Schwab, M.E. (2005) Nogo-A antibody improves regeneration and locomotion of spinal cord-injured rats. *Ann Neurol* **58**: 706-719.
- Liesi, P. (1985) Laminin-immunoreactive glia distinguish regenerative adult CNS systems from non-regenerative ones. *Embo J* **4**: 2505-2511.
- Lipson, A.C., Widenfalk, J., Lindqvist, E., Ebendal, T., and Olson, L. (2003) Neurotrophic properties of olfactory ensheathing glia. *Exp Neurol* **180**: 167-171.
- Liu, F., Luo, Z.J., You, S.W., Jiao, X.Y., Meng, X.M., Shi, M., Wang, C.T., and Ju, G. (2003) Significance of fixation of the vertebral column for spinal cord injury experiments. *Spine* **28**: 1666-1671.
- Liu, Y., Himes, B.T., Murray, M., Tessler, A., and Fischer, I. (2002) Grafts of BDNF-producing fibroblasts rescue axotomized rubrospinal neurons and prevent their atrophy. *Exp Neurol* **178**: 150-164.
- Lopez-Vales, R., Fores, J., Verdu, E., and Navarro, X. (2005) Acute and delayed transplantation of olfactory ensheathing cells promote partial recovery after complete transection of the spinal cord. *Neurobiol Dis.*
- Lu, J., Feron, F., Ho, S.M., Mackay-Sim, A., and Waite, P.M. (2001) Transplantation of nasal olfactory tissue promotes partial recovery in paraplegic adult rats. *Brain Res* **889**: 344-357.
- Lu, J., Feron, F., Mackay-Sim, A., and Waite, P.M. (2002) Olfactory ensheathing cells promote locomotor recovery after delayed transplantation into transected spinal cord. *Brain* **125**: 14-21.
- Lu, P., Yang, H., Culbertson, M., Graham, L., Roskams, A.J., and Tuszynski, M.H. (2006) Olfactory ensheathing cells do not exhibit unique migratory or axonal

- growth-promoting properties after spinal cord injury. *J Neurosci* **26**(43): 11120-30.
- Machida, M., Saito, M., Dubousset, J., Yamada, T., Kimura, J., and Shibasaki, K. (2005) Pathological mechanism of idiopathic scoliosis: experimental scoliosis in pinealectomized rats. *Eur Spine J.* **14**(9): 843-8.
- Mackay-Sim, A. (2005) Olfactory ensheathing cells and spinal cord repair. *Keio J Med* **54**: 8-14.
- Margolis, R.U., and Margolis, R.K. (1997) Chondroitin sulfate proteoglycans as mediators of axon growth and pathfinding. *Cell Tissue Res* **290**: 343-348.
- Marin-Padilla, M., and Amieva, M.R. (1989) Early neurogenesis of the mouse olfactory nerve: Golgi and electron microscopic studies. *J Comp Neurol* **288**: 339-352.
- Markus, A., Patel, T.D., and Snider, W.D. (2002) Neurotrophic factors and axonal growth. *Curr Opin Neurobiol* **12**: 523-531.
- Martin, D., Schoenen, J., Delree, P., Gilson, V., Rogister, B., Leprince, P., Stevenaert, A., and Moonen, G. (1992) Experimental acute traumatic injury of the adult rat spinal cord by a subdural inflatable balloon: methodology, behavioral analysis, and histopathology. *J Neurosci Res* **32**: 539-550.
- Martin, G.M., Sprague, C.A., and Epstein, C.J. (1970) Replicative life-span of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue, and genotype. *Lab Invest* **23**: 86-92.
- McDonald, J.W., and Howard, M.J. (2002) Repairing the damaged spinal cord: a summary of our early success with embryonic stem cell transplantation and remyelination. *Prog Brain Res* **137**: 299-309.
- McDonnell, T., Houston, F., Byrne, D., Gorman, C., and Claffey, N. (2004) The effect of time lapse on the accuracy of two acrylic resins used to assemble an implant framework for soldering. *J Prosthet Dent* **91**: 538-540.
- McKerracher, L., David, S., Jackson, D.L., Kottis, V., Dunn, R.J., and Braun, P.E. (1994) Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* **13**: 805-811.
- Merrill, J.E., and Benveniste, E.N. (1996) Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci* **19**: 331-338.
- Mesulam, M.M. (1982) Tracing neural connections with horseradish peroxidase. New York: ed. Wiley and Sons.

- Metz, G.A., Merkler, D., Dietz, V., Schwab, M.E., and Fouad, K. (2000) Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. *Brain Res* **883**: 165-177.
- Miragall, F., Kadmon, G., Husmann, M., and Schachner, M. (1988) Expression of cell adhesion molecules in the olfactory system of the adult mouse: presence of the embryonic form of N-CAM. *Dev Biol* **129**: 516-531.
- Miranda, J.D., White, L.A., Marcillo, A.E., Willson, C.A., Jagid, J., and Whittemore, S.R. (1999) Induction of Eph B3 after spinal cord injury. *Exp Neurol* **156**: 218-222.
- Molteni, R., Zheng, J.Q., Ying, Z., Gomez-Pinilla, F., and Twiss, J.L. (2004) Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 8473-8478.
- Moon, L., and Bunge, M.B. (2005) From animal models to humans: strategies for promoting CNS axon regeneration and recovery of limb function after spinal cord injury. *J Neurol Phys Ther* **29**: 55-69.
- Morgenstern, D.A., Asher, R.A., and Fawcett, J.W. (2002) Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response. *Prog Brain Res* **137**: 313-332.
- Mori, S., and Leblond, C.P. (1969) Electron microscopic features and proliferation of astrocytes in the corpus callosum of the rat. *J Comp Neurol* **137**: 197-225.
- Muir, G.D., and Webb, A.A. (2000) Mini-review: assessment of behavioural recovery following spinal cord injury in rats. *Eur J Neurosci* **12**: 3079-3086.
- Mukhopadhyay, G., Doherty, P., Walsh, F.S., Crocker, P.R., and Filbin, M.T. (1994) A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron* **13**: 757-767.
- Nash, H.H., Borke, R.C., and Anders, J.J. (2002) Ensheathing cells and methylprednisolone promote axonal regeneration and functional recovery in the lesioned adult rat spinal cord. *J Neurosci* **22**: 7111-7120.
- Nathan, P.W. (1994) Effects on movement of surgical incisions into the human spinal cord. *Brain* **117 (Pt 2)**: 337-346.
- Navarro, X., Valero, A., Gudino, G., Fores, J., Rodriguez, F.J., Verdu, E., Pascual, R., Cuadras, J., and Nieto-Sampedro, M. (1999) Ensheathing glia transplants promote dorsal root regeneration and spinal reflex restitution after multiple lumbar rhizotomy. *Ann Neurol* **45**: 207-215.

- Neumann, S., Bradke, F., Tessier-Lavigne, M., and Basbaum, A.I. (2002) Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation. *Neuron* **34**: 885-893.
- Nieto, J.H., Hoang, T.X., Warner, E.A., Franchini, B.T., Westerlund, U., and Havton, L.A. (2005) Titanium mesh implantation--a method to stabilize the spine and protect the spinal cord following a multilevel laminectomy in the adult rat. *J Neurosci Methods* **147**: 1-7.
- Nieto-Sampedro, M., Gomez-Pinilla, F., Knauer, D.J., and Broderick, J.T. (1988) Epidermal growth factor receptor immunoreactivity in rat brain astrocytes. Response to injury. *Neurosci Lett* **91**: 276-282.
- Nikulina, E., Tidwell, J.L., Dai, H.N., Bregman, B.S., and Filbin, M.T. (2004) The phosphodiesterase inhibitor rolipram delivered after a spinal cord lesion promotes axonal regeneration and functional recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 8786-8790.
- Oudega, M., Vargas, C.G., Weber, A.B., Kleitman, N., and Bunge, M.B. (1999) Long-term effects of methylprednisolone following transection of adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci* **11**: 2453-2464.
- Oudega, M., Rosano, C., Sadi, D., Wood, P.M., Schwab, M.E., and Hagg, T. (2000) Neutralizing antibodies against neurite growth inhibitor NI-35/250 do not promote regeneration of sensory axons in the adult rat spinal cord. *Neuroscience* **100**: 873-883.
- Panter, S.S., Yum, S.W., and Faden, A.I. (1990) Alteration in extracellular amino acids after traumatic spinal cord injury. *Ann Neurol* **27**: 96-99.
- Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., and Campisi, J. (2003) Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* **5**: 741-747.
- Pascual, J.I., Gudino-Cabrera, G., Insausti, R., and Nieto-Sampedro, M. (2002) Spinal implants of olfactory ensheathing cells promote axon regeneration and bladder activity after bilateral lumbosacral dorsal rhizotomy in the adult rat. *J Urol* **167**: 1522-1526.
- Pasterkamp, R.J., De Winter, F., Holtmaat, A.J., and Verhaagen, J. (1998) Evidence for a role of the chemorepellent semaphorin III and its receptor neuropilin-1 in the regeneration of primary olfactory axons. *J Neurosci* **18**: 9962-9976.

- Paxinos, G. (1995) *The rat nervous system*. Australia: Academic Press.
- Pearse, D.D., Pereira, F.C., Marcillo, A.E., Bates, M.L., Berrocal, Y.A., Filbin, M.T., and Bunge, M.B. (2004) cAMP and Schwann cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. *Nat Med* **10**: 610-616.
- Pearson, H. (2003) Spinal injuries: In search of a miracle. *Nature* **423**: 112-113.
- Pearson, K.G. (2001) Could enhanced reflex function contribute to improving locomotion after spinal cord repair? *J Physiol* **533**: 75-81.
- Perry, V.H., and Gordon, S. (1988) Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci* **11**: 273-277.
- Petratos, S., Butzkueven, H., Shipham, K., Cooper, H., Bucci, T., Reid, K., Lopes, E., Emery, B., Cheema, S.S., and Kilpatrick, T.J. (2003) Schwann cell apoptosis in the postnatal axotomized sciatic nerve is mediated via NGF through the low-affinity neurotrophin receptor. *J Neuropathol Exp Neurol* **62**: 398-411.
- Pixley, S.K. (1992) The olfactory nerve contains two populations of glia, identified both in vivo and in vitro. *Glia* **5**: 269-284.
- Plant, G.W., Christensen, C.L., Oudega, M., and Bunge, M.B. (2003) Delayed transplantation of olfactory ensheathing glia promotes sparing/regeneration of supraspinal axons in the contused adult rat spinal cord. *J Neurotrauma* **20**: 1-16.
- Pollock, G.S., Franceschini, I.A., Graham, G., Marchionni, M.A., and Barnett, S.C. (1999) Neuregulin is a mitogen and survival factor for olfactory bulb ensheathing cells and an isoform is produced by astrocytes. *Eur J Neurosci* **11**: 769-780.
- Popovich, P.G., Wei, P., and Stokes, B.T. (1997) Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Comp Neurol* **377**: 443-464.
- Prieto, M., Chauvet, N., and Alonso, G. (2000) Tanycytes transplanted into the adult rat spinal cord support the regeneration of lesioned axons. *Exp Neurol* **161**: 27-37.
- Profyris, C., Cheema, S.S., Zang, D., Azari, M.F., Boyle, K., and Petratos, S. (2004) Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiol Dis* **15**: 415-436.

- Qiu, J., Cai, D., Dai, H., McAtee, M., Hoffman, P.N., Bregman, B.S., and Filbin, M.T. (2002) Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP. *Neuron* **34**: 895-903.
- Raff, M.C., Miller, R.H., and Noble, M. (1983) A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* **303**: 390-396.
- Raisman, G. (1985) Specialized neuroglial arrangement may explain the capacity of vomeronasal axons to reinnervate central neurons. *Neuroscience* **14**: 237-254.
- Ramer, L.M., Au, E., Richter, M.W., Liu, J., Tetzlaff, W., and Roskams, A.J. (2004a) Peripheral olfactory ensheathing cells reduce scar and cavity formation and promote regeneration after spinal cord injury. *J Comp Neurol* **473**: 1-15.
- Ramer, L.M., Richter, M.W., Roskams, A.J., Tetzlaff, W., and Ramer, M.S. (2004b) Peripherally-derived olfactory ensheathing cells do not promote primary afferent regeneration following dorsal root injury. *Glia* **47**: 189-206.
- Ramon-Cueto, A., and Nieto-Sampedro, M. (1992) Glial cells from adult rat olfactory bulb: immunocytochemical properties of pure cultures of ensheathing cells. *Neuroscience* **47**: 213-220.
- Ramon-Cueto, A., Perez, J., and Nieto-Sampedro, M. (1993) In vitro enfolding of olfactory neurites by p75 NGF receptor positive ensheathing cells from adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* **5**: 1172-1180.
- Ramon-Cueto, A., and Nieto-Sampedro, M. (1994) Regeneration into the spinal cord of transected dorsal root axons is promoted by ensheathing glia transplants. *Exp Neurol* **127**: 232-244.
- Ramon-Cueto, A., and Valverde, F. (1995) Olfactory bulb ensheathing glia: a unique cell type with axonal growth-promoting properties. *Glia* **14**: 163-173.
- Ramon-Cueto, A., and Avila, J. (1998) Olfactory ensheathing glia: properties and function. *Brain Res Bull* **46**: 175-187.
- Ramon-Cueto, A., Plant, G.W., Avila, J., and Bunge, M.B. (1998) Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J Neurosci* **18**: 3803-3815.
- Ramon-Cueto, A. (2000) Olfactory ensheathing glia transplantation into the injured spinal cord. *Prog Brain Res* **128**: 265-272.

- Ramon-Cueto, A., Cordero, M.I., Santos-Benito, F.F., and Avila, J. (2000) Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron* **25**: 425-435.
- Ramon-Cueto, A., and Santos-Benito, F.F. (2001) Cell therapy to repair injured spinal cords: olfactory ensheathing glia transplantation. *Restor Neurol Neurosci* **19**: 149-156.
- Rapalino, O., Lazarov-Spiegler, O., Agranov, E., Velan, G.J., Yoles, E., Fraidakis, M., Solomon, A., Gepstein, R., Katz, A., Belkin, M., Hadani, M., and Schwartz, M. (1998) Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat Med* **4**: 814-821.
- Rauch, U., Clement, A., Retzler, C., Frohlich, L., Fassler, R., Gohring, W., and Faissner, A. (1997) Mapping of a defined neurocan binding site to distinct domains of tenascin-C. *J Biol Chem* **272**: 26905-26912.
- Reier, P.J., Stokes, B.T., Thompson, F.J., and Anderson, D.K. (1992) Fetal cell grafts into resection and contusion/compression injuries of the rat and cat spinal cord. *Exp Neurol* **115**: 177-188.
- Reier, P.J. (2004) Cellular Transplantation Strategies for Spinal Cord Injury and Translational Neurobiology. *NeuroRx* **1**: 424-451.
- Reinhard, E., Meier, R., Halfter, W., Rovelli, G., and Monard, D. (1988) Detection of glia-derived nexin in the olfactory system of the rat. *Neuron* **1**: 387-394.
- Rexed, B. (1952). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* **96**(3): 414-95.
- Richter, M.W., Fletcher, P.A., Liu, J., Tetzlaff, W., and Roskams, A.J. (2005) Lamina propria and olfactory bulb ensheathing cells exhibit differential integration and migration and promote differential axon sprouting in the lesioned spinal cord. *J Neurosci* **25**: 10700-10711.
- Ridet, J.L., Malhotra, S.K., Privat, A., and Gage, F.H. (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* **20**: 570-577.
- Rohme, D. (1981) Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and life spans of normal fibroblasts in vitro and erythrocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 5009-5013.

- Rosenberg, M.B., Friedmann, T., Robertson, R.C., Tuszynski, M., Wolff, J.A., Breakefield, X.O., and Gage, F.H. (1988) Grafting genetically modified cells to the damaged brain: restorative effects of NGF expression. *Science* **242**: 1575-1578.
- Rossignol, S. (2006) Plasticity of connections underlying locomotor recovery after central and/or peripheral lesions in the adult mammals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**: 1647-1671.
- Rouiller, E.M., Moret, V., Tanne, J., and Boussaoud, D. (1996) Evidence for direct connections between the hand region of the supplementary motor area and cervical motoneurons in the macaque monkey. *Eur J Neurosci* **8**: 1055-1059.
- Ruitenbergh, M.J., Plant, G.W., Christensen, C.L., Blits, B., Niclou, S.P., Harvey, A.R., Boer, G.J., and Verhaagen, J. (2002) Viral vector-mediated gene expression in olfactory ensheathing glia implants in the lesioned rat spinal cord. *Gene Ther* **9**: 135-146.
- Ruitenbergh, M.J., Plant, G.W., Hamers, F.P., Wortel, J., Blits, B., Dijkhuizen, P.A., Gispen, W.H., Boer, G.J., and Verhaagen, J. (2003) Ex vivo adenoviral vector-mediated neurotrophin gene transfer to olfactory ensheathing glia: effects on rubrospinal tract regeneration, lesion size, and functional recovery after implantation in the injured rat spinal cord. *J Neurosci* **23**: 7045-7058.
- Ruitenbergh, M.J., Levison, D.B., Lee, S.V., Verhaagen, J., Harvey, A.R., and Plant, G.W. (2005) NT-3 expression from engineered olfactory ensheathing glia promotes spinal sparing and regeneration. *Brain* **128**: 839-853.
- Ruitenbergh, M.J., Vukovic, J., Sarich, J., Busfield, S.J., and Plant, G.W. (2006) Olfactory Ensheathing Cells: Characteristics, Genetic Engineering, and Therapeutic Potential. *J Neurotrauma* **23**: 468-478.
- Saito, H., Hammond, A.T., and Moses, R.E. (1995) The effect of low oxygen tension on the in vitro-replicative life span of human diploid fibroblast cells and their transformed derivatives. *Exp Cell Res* **217**: 272-279.
- Samanen, D.W., and Forbes, W.B. (1984) Replication and differentiation of olfactory receptor neurons following axotomy in the adult hamster: a morphometric analysis of postnatal neurogenesis. *J Comp Neurol* **225**: 201-211.



- Santos-Benito, F.F., and Ramon-Cueto, A. (2003) Olfactory ensheathing glia transplantation: a therapy to promote repair in the mammalian central nervous system. *Anat Rec* **271B**: 77-85.
- Santos-Benito, F.F., Munoz-Quiles, C., and Ramon-Cueto, A. (2006) Long-term care of paraplegic laboratory mammals. *J Neurotrauma* **23**: 521-536.
- Schnell, L., and Schwab, M.E. (1990) Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature* **343**: 269-272.
- Schnell, L., Schneider, R., Kolbeck, R., Barde, Y.A., and Schwab, M.E. (1994) Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature* **367**: 170-173.
- Schwab, J.M., Conrad, S., Elbert, T., Trautmann, K., Meyermann, R., and Schluesener, H.J. (2004) Lesional RhoA+ cell numbers are suppressed by anti-inflammatory, cyclooxygenase-inhibiting treatment following subacute spinal cord injury. *Glia* **47**: 377-386.
- Schwab, J.M., Brechtel, K., Mueller, C.A., Failli, V., Kaps, H.P., Tuli, S.K., and Schluesener, H.J. (2006) Experimental strategies to promote spinal cord regeneration--an integrative perspective. *Prog Neurobiol* **78**: 91-116.
- Schwab, M.E., Kapfhammer, J.P., and Bandtlow, C.E. (1993) Inhibitors of neurite growth. *Annu Rev Neurosci* **16**: 565-595.
- Schwartz, M., and Yoles, E. (2006) Immune-based therapy for spinal cord repair: autologous macrophages and beyond. *J Neurotrauma* **23**: 360-370.
- Senut, M.C., Tuszynski, M.H., Raymon, H.K., Suhr, S.T., Liou, N.H., Jones, K.R., Reichardt, L.F., and Gage, F.H. (1995) Regional differences in responsiveness of adult CNS axons to grafts of cells expressing human neurotrophin 3. *Exp Neurol* **135**: 36-55.
- Shao, Z., Browning, J.L., Lee, X., Scott, M.L., Shulga-Morskaya, S., Allaire, N., Thill, G., Levesque, M., Sah, D., McCoy, J.M., Murray, B., Jung, V., Pepinsky, R.B., and Mi, S. (2005) TAJ/TROY, an orphan TNF receptor family member, binds Nogo-66 receptor 1 and regulates axonal regeneration. *Neuron* **45**: 353-359.
- Shen, H., Tang, Y., Wu, Y., Chen, Y., and Cheng, Z. (2002) Influences of olfactory ensheathing cells transplantation on axonal regeneration in spinal cord of adult rats. *Chin J Traumatol* **5**: 136-141.

- Sherr, C.J., and DePinho, R.A. (2000) Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* **102**: 407-410.
- Shibayama, M., Hattori, S., Himes, B.T., Murray, M., and Tessler, A. (1998) Neurotrophin-3 prevents death of axotomized Clarke's nucleus neurons in adult rat. *J Comp Neurol* **390**: 102-111.
- Shimizu, Y., Suzuki, J., Terao, K., and Ishida, T. (2003) In vitro aging of macaque adherent cells: similar pattern of cellular aging between human and macaque. *Mech Ageing Dev* **124**: 237-244.
- Smith, P.M., Lakatos, A., Barnett, S.C., Jeffery, N.D., and Franklin, R.J. (2002) Cryopreserved cells isolated from the adult canine olfactory bulb are capable of extensive remyelination following transplantation into the adult rat CNS. *Exp Neurol* **176**: 402-406.
- Song, H., Ming, G., He, Z., Lehmann, M., McKerracher, L., Tessier-Lavigne, M., and Poo, M. (1998) Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science* **281**: 1515-1518.
- Song, X.Y., Zhou, F.H., Zhong, J.H., Wu, L.L., and Zhou, X.F. (2005) Knockout of p75 impairs re-myelination of injured sciatic nerve in mice. *J Neurochem*.
- Sonigra, R.J., Kandiah, S.S., and Wigley, C.B. (1996) Spontaneous immortalisation of ensheathing cells from adult rat olfactory nerve. *Glia* **16**: 247-256.
- Sonigra, R.J., Brighton, P.C., Jacoby, J., Hall, S., and Wigley, C.B. (1999) Adult rat olfactory nerve ensheathing cells are effective promoters of adult central nervous system neurite outgrowth in coculture. *Glia* **25**: 256-269.
- Steinert, S., White, D.M., Zou, Y., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2002) Telomere biology and cellular aging in nonhuman primate cells. *Exp Cell Res* **272**: 146-152.
- Steward, O., Zheng, B., and Tessier-Lavigne, M. (2003) False resurrections: distinguishing regenerated from spared axons in the injured central nervous system. *J Comp Neurol* **459**: 1-8.
- Steward, O., Sharp, K., Selvan, G., Hadden, A., Hofstadter, M., Au, E., and Roskams, J. (2006) A re-assessment of the consequences of delayed transplantation of olfactory lamina propria following complete spinal cord transection in rats. *Exp Neurol*.
- Stichel, C.C., Hermanns, S., Luhmann, H.J., Lausberg, F., Niermann, H., D'Urso, D., Servos, G., Hartwig, H.G., and Muller, H.W. (1999) Inhibition of collagen IV

- deposition promotes regeneration of injured CNS axons. *Eur J Neurosci* **11**: 632-646.
- Stokes, B.T., Noyes, D.H., and Behrmann, D.L. (1992) An electromechanical spinal injury technique with dynamic sensitivity. *J Neurotrauma* **9**: 187-195.
- Suter, D.M., and Forscher, P. (1998) An emerging link between cytoskeletal dynamics and cell adhesion molecules in growth cone guidance. *Curr Opin Neurobiol* **8**: 106-116.
- Suter, D.M., and Forscher, P. (2000) Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *J Neurobiol* **44**: 97-113.
- Takami, T., Oudega, M., Bates, M.L., Wood, P.M., Kleitman, N., and Bunge, M.B. (2002) Schwann cell but not olfactory ensheathing glia transplants improve hindlimb locomotor performance in the moderately contused adult rat thoracic spinal cord. *J Neurosci* **22**: 6670-6681.
- Tanaka, H., Takahashi, S., and Oki, J. (1997) Developmental regulation of spinal motoneurons by monoaminergic nerve fibers. *J Peripher Nerv Syst* **2**: 323-332.
- Tang, D.G., Tokumoto, Y.M., Apperly, J.A., Lloyd, A.C., and Raff, M.C. (2001) Lack of replicative senescence in cultured rat oligodendrocyte precursor cells. *Science* **291**: 868-871.
- Tang, X., Davies, J.E., and Davies, S.J. (2003) Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan, brevican, versican V2, and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue. *J Neurosci Res* **71**: 427-444.
- Tator, C.H. (1995) Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain Pathol* **5**: 407-413.
- Thoenen, H., and Sendtner, M. (2002) Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nat Neurosci* **5 Suppl**: 1046-1050.
- Thompson, R.J., Roberts, B., Alexander, C.L., Williams, S.K., and Barnett, S.C. (2000) Comparison of neuregulin-1 expression in olfactory ensheathing cells, Schwann cells and astrocytes. *J Neurosci Res* **61**: 172-185.

- Tobias, C.A., Shumsky, J.S., Shibata, M., Tuszynski, M.H., Fischer, I., Tessler, A., and Murray, M. (2003) Delayed grafting of BDNF and NT-3 producing fibroblasts into the injured spinal cord stimulates sprouting, partially rescues axotomized red nucleus neurons from loss and atrophy, and provides limited regeneration. *Exp Neurol* **184**: 97-113.
- Tracey, D. J. (1995) Ascending and descending pathways in the spinal cord. In *The rat nervous system*. Vol. Primary afferent projections to the spinal cord. G, P. (ed). San Diego: Academic Press, pp. 67-75.
- Tuszynski, M.H., Murai, K., Blesch, A., Grill, R., and Miller, I. (1997) Functional characterization of NGF-secreting cell grafts to the acutely injured spinal cord. *Cell Transplant* **6**: 361-368.
- Ubink, R., and Hokfelt, T. (2000) Expression of neuropeptide Y in olfactory ensheathing cells during prenatal development. *J Comp Neurol* **423**: 13-25.
- Vacanti, V., Kong, E., Suzuki, G., Sato, K., Canty, J.M., and Lee, T. (2005) Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture. *J Cell Physiol* **205**: 194-201.
- Valverde, F., and Lopez-Mascaraque, L. (1991) Neuroglial arrangements in the olfactory glomeruli of the hedgehog. *J Comp Neurol* **307**: 658-674.
- Velardo, M.J., Burger, C., Williams, P.R., Baker, H.V., Lopez, M.C., Mareci, T.H., White, T.E., Muzyczka, N., and Reier, P.J. (2004) Patterns of gene expression reveal a temporally orchestrated wound healing response in the injured spinal cord. *J Neurosci* **24**: 8562-8576.
- Verdu, E., Garcia-alias, G., Fores, J., Gudino-Cabrera, G., Muneton, V.C., Nieto-Sampedro, M., and Navarro, X. (2001) Effects of ensheathing cells transplanted into photochemically damaged spinal cord. *Neuroreport* **12**: 2303-2309.
- Verdu, E., Garcia-alias, G., Fores, J., Lopez-Vales, R., and Navarro, X. (2003) Olfactory ensheathing cells transplanted in lesioned spinal cord prevent loss of spinal cord parenchyma and promote functional recovery. *Glia* **42**: 275-286.
- Wang, J.J., Chuah, M.I., Yew, D.T., Leung, P.C., and Tsang, D.S. (1995) Effects of astrocyte implantation into the hemisectioned adult rat spinal cord. *Neuroscience* **65**: 973-981.

- Wang, K.C., Kim, J.A., Sivasankaran, R., Segal, R., and He, Z. (2002a) P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* **420**: 74-78.
- Wang, K.C., Koprivica, V., Kim, J.A., Sivasankaran, R., Guo, Y., Neve, R.L., and He, Z. (2002b) Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* **417**: 941-944.
- Warden, P., Bamber, N.I., Li, H., Esposito, A., Ahmad, K.A., Hsu, C.Y., and Xu, X.M. (2001) Delayed glial cell death following wallerian degeneration in white matter tracts after spinal cord dorsal column cordotomy in adult rats. *Exp Neurol* **168**: 213-224.
- Wewetzer, K., Grothe, C., and Claus, P. (2001) In vitro expression and regulation of ciliary neurotrophic factor and its alpha receptor subunit in neonatal rat olfactory ensheathing cells. *Neurosci Lett* **306**: 165-168.
- Wewetzer, K., Verdu, E., Angelov, D.N., and Navarro, X. (2002) Olfactory ensheathing glia and Schwann cells: two of a kind? *Cell Tissue Res* **309**: 337-345.
- Whishaw, I.Q., Gorny, B., and Sarna, J. (1998) Paw and limb use in skilled and spontaneous reaching after pyramidal tract, red nucleus and combined lesions in the rat: behavioral and anatomical dissociations. *Behav Brain Res* **93**: 167-183.
- Woodhall, E., West, A.K., and Chuah, M.I. (2001) Cultured olfactory ensheathing cells express nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, glia cell line-derived neurotrophic factor and their receptors. *Brain Res Mol Brain Res* **88**: 203-213.
- Woolf, C.J. (2001) Turbocharging neurons for growth: accelerating regeneration in the adult CNS. *Nat Neurosci* **4**: 7-9.
- Xu, X.M., Chen, A., Guenard, V., Kleitman, N., and Bunge, M.B. (1997) Bridging Schwann cell transplants promote axonal regeneration from both the rostral and caudal stumps of transected adult rat spinal cord. *J Neurocytol* **26**: 1-16.
- Yamauchi, J., Chan, J.R., and Shooter, E.M. (2004) Neurotrophins regulate Schwann cell migration by activating divergent signaling pathways dependent on Rho GTPases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 8774-8779.

## Bibliografía

---

- Yan, P., Li, Q., Kim, G.M., Xu, J., Hsu, C.Y., and Xu, X.M. (2001) Cellular localization of tumor necrosis factor-alpha following acute spinal cord injury in adult rats. *J Neurotrauma* **18**: 563-568.
- Zhang, Y., Winterbottom, J.K., Schachner, M., Lieberman, A.R., and Anderson, P.N. (1997) Tenascin-C expression and axonal sprouting following injury to the spinal dorsal columns in the adult rat. *J Neurosci Res* **49**: 433-450.

